

Vol. I, No. 1

JANUARY, 1922

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

TORASABURO ARAKI, Kyoto.	KIKUNAE IKEDA, Tokyo.
KATSUJI INOUE, Sendai.	YASHIRO KOTAKE, Osaka.
SHIGERU KOMATSU, Kyoto.	KANAYE MAYEDA, Kyoto.
KOJI MIYAKE, Sapporo.	TAKAOKI SASAKI, Tokyo.
TORAI SHIMAMURA, Tokyo.	KENZO SUTO, Kanasawa.
UMETARO SUZUKI, Tokyo.	MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP
501
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

Motofujicho, Hongo

Price { ¥10.00 per volume, Nippon
¥11.00 per volume, other countries

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

TORASABURO ARAKI, Kyoto.	KIKUNAE IKEDA, Tokyo.
KATSUJI INOUE, Sendai.	YASHIRO KOTAKE, Osaka.
SHIGERU KOMATSU, Kyoto.	KANAYE MAYEDA, Kyoto.
KOJI MIYAKE, Sapporo.	YUZURU OKUDA, Fukuoka.
TAKAOKI SASAKI, Tokyo.	TORAI SHIMAMURA, Tokyo.
KENZO SUTO, Kanasawa.	YUTAKA TERUUCHI, Tokyo.
UMETARO SUZUKI, Tokyo.	MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.
KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.	

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME I

TOKYO

1922

COPYRIGHT 1922
BY
THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS OF VOLUME I.

No. 1, JANUARY, 1922.

KAKIUCHI, SAMURO. Foreword.	
SANO, MINORU. Phosphatides of the fish sperm	1
SANO, MINORU. Contribution to the optical properties of sphingomyelin....	17
HASHIDA, KUNISHIKO. Untersuchungen über das elektromotorische Verhalten der Froschhaut. I. Teil. Die Abhängigkeit des elektromotorischen Verhaltens der Froschhaut von den ableitenden Flüssigkeiten	21
MORIMOTO, YOSHIO. The urea content of cow's milk. A simple method of determining urea	69
KIKUCHI, MITSUGI. Beiträge zum Purinstoffwechsel. I. Über das Schicksal des aufgenommenen Purins	83
TAKATA, MAKI. Studies in the gastric juice. III. On the empty stomach juice, the secretion at the time when the stomach is empty.....	107
MIYAKE, KOJI and SŌMA, S. Further studies of the nature of nitrification.	123
MAYEDA, MINORU. Preliminary communication on mannanase and laevidulinase	131
SAKAGUCHI, Kōzō, ASAKAWA, OSAMU und MATSUYAMA, TOSHITANE. Über die Bestimmung der Assimilationskraft des Menschen für Kohlenhydrat.	139
FUKUSHIMA, KANSHI. Beiträge zur glykolytischen Wirkung der Leukozyten. I.	151
KOTAKE, YASHIRO und OKAGAWA, M. Über den Einfluss des optischen Drehungsvermögens auf die Zell-permeabilität. I. Mitteilung	159
KAKIUCHI, SAMURO. Studies on physico-chemical properties of phospholipin. I. The precipitation of lecithin-hydrosol by electrolytes	165

No. 2, APRIL, 1922.

MATSUOKA, Z. und TAKEMURA, S. Über die synthetische Bildung der Kynurensäure in der überlebenden Leber.....	175
KOMATSU, SHIGERU and UEDA, HIDENOSUKE. On the biochemical study of the ripening of the Kaki-Fruit I. Chemical composition of the fruit I.	181
WATANABE, C. K. Studies in the metabolic changes induced by the administration of guanidine bases. VI. The influence of guanidine acidosis on the fat content of the blood	195
GOTO, KIKO. The nature of the carbohydrates in the leaf, stem and tuber of <i>Amorphophallus konjaku</i> and their variations in amount under different condition	201
KODAMA, SHINTARO. Studies on amino-acids. I. On the formation of some volatile oil from leucine	213
FUSE, NOBUYOSHI. Kleine Mitteilung betreffend den Fermentgehalt des Schlangenseichels	219

MIYAKE, KOJI und ADACHI, MASASHI. Chemische Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit der Reisarten gegen die "IMOCHI-KRANKHEIT." Erster Bericht. Vergleich der hauptsächlichsten chemischen Bestandteile von vorläufig zwei in Hokkaido angebauten Reisarten, einer empfindlichen und einer widerstandsfähigen	223
MIYAKE, KOJI und ADACHI, MASASHI. Chemische Untersuchung über die Widerstandsfähigkeit der Reisarten gegen die "IMOCHI-KRANKHEIT." Zweiter Bericht. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum des Pilzes	241
SHIBATA, NAGAMICHI. Zur Frage der Fettzersetzung einiger Saprophyten ..	249
NESHIKATA, TOKIO. Ein experimenteller Beitrag zum Studium der Fettbildung aus Eiweiss Beim Wachstum der Fliegenmaden	261
KODAMA, SAKUJI. Some modifications of the colorimetric method for the determination of adrenalin by Folin, Cannon and Denis	281
HASHIDA, KUNIHICO. Untersuchungen über das elektromotorische Verhalten der Froshhaut. II. Einige Zusatzexperimente und die Schlussfolgerung. 2 39	299
GOTO, KIKO. On the calcium and magnesium content of the blood and tissues of a starved animal	321

No. 3, JULY, 1922.

KAGEURA, NAOMI. Über den Einfluss der Eiweiss-Fettdiät auf den Kohlenhydratstoffwechsel. I. Mitteilung	333
YOSHIMUKA, KIYOHISA. Beiträge zur Kenntnis der stickstoffhaltigen Bestandteile der Früchte der Chayote (Hayato-uri)	347
KOGANEI, RYOICHI. Studies on the fatty substances of tubercle bacilli and their acidproof staining property	353
HATTORI, GISABURO and KOMATSU, SEIGERU. The prolamin of Coix lacryma L.	365
SAKAGUCHI, KOZO, MATSUYAMA, TOSHITANE und WATANABE, KAZUO. Über die alimentäre Blutzuckersteigerung des Gesunden beim gewöhnlichen Leben.	371
KUSUNOKI, MICHIO. On the bactericidal action of hydrosol of silver.	381
KAGEURA, NAOMI. Über den Einfluss der Eiweiss-Fettdiät auf den Kohlenhydratstoffwechsel. II. Mitteilung	389
KAKIUCHI, SAMURO and KOGANEI, SANJI. The effect of the electrolytes on the turbidity point of the albumin solution	405
KODAMA, KEIZO. On the solubility of globulin in neutral salt solution.	419
TADOKORO, TETSUTARO and SATO, SHŌICHI. Studies on the protective colloids of milk.	433
TSUKIYE, SOGEN und OKADA, TAKEO. Über den Einfluss des Vitamins (B) auf die Verdauungsfunktion.	445
AIBARA, CHISATO. Beiträge zur Frage der Glykolyse	457
TAYA, MAKOTO. Beiträge zur Kenntnis des Einflusses der Aussentemperatur auf den Blutzuckergehalt.	479

FOREWORD.

During the last decade the number of published works in biochemistry in our country has greatly increased. Until the beginning of the world war of 1914-1918 a large number of the graduates of our universities and colleges went abroad for their postgraduate research work. During the war, however, the number of research students in each of our laboratories has been increased many fold, and the status of science now in our country has passed so to speak from the exclusively educational stage into that of laboratorial research. As a result there is now an increasing demand at home and abroad for an organization for publishing our works internationally. On the one hand, owing to the situation of our country remote as it is from the centres of science abroad, there are always some difficulties in contributing our reports to foreign journals, causing a delay in publication at times of more than half a year. On the other hand, as most of our reports are published in our mother tongue, many friends abroad regret the inaccessibility of some of our valuable works. Stimulated by these increasing demands we have decided with the cooperation of certain of our biochemists to issue this journal in the interest of biochemistry. Although there will be no limitation as to the language to be used in the journal provided it is written in roman characters, it is quite obvious that most of them will be English, German or French.

May this little "Journal of Biochemistry" have a prosperous future and be a contribution, though small, toward the promotion of true knowledge.

Tokyo, January 1922.

Samuro Kakiuchi



Digitized by the Internet Archive
in 2024

PHOSPHATIDES OF THE FISH SPERM.

By

MINORU SANO.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tohoku Imperial University, Sendai. Director : Prof. Katsuji Inouye.)

(Received for publication, December 8, 1921.)

SECTION I. INTRODUCTORY.

Over 25 years ago Miescher (1896) first recognized the existence of phosphatides in the fish sperm. In his epoch-making investigations on the chemistry of the sperms, he stated that about one half of the alcohol-ether extract of the tails of salmon spermatozoa was composed of lecithin. The work of subsequent investigators, however, was almost limited to the researches in the constituents of the heads of spermatozoa. Regarding the composition of the tails no essential progress has been made up to the present. But the recent progress of our knowledge of lipid substances makes it now possible and desirable to resume the studies in the problem.

In the following work I have attempted to isolate the individual phosphatides present in the sperm of porgy, of salmon and codfish, and to see, if possible, whether the composition of these phosphatides is identical with that of the phosphatides obtained from the brain tissue.

The separation and the purification of phosphatides were effected mainly by applying the principle of selective extraction as introduced by Rosenheim and Tebb (1908).

But, I have principally made use of single solvents, dried and purified as far as possible. The use of a mixture of solvents, as recommended by the authors, does not seem advisable; it renders the separation more difficult. Further, every manipulation, such as extraction, fractionation, dissolving and precipitating, in the

following researches was repeated several times, and the passing over to a new solvent was always preceded by the complete removal of the former one. Special care was taken also to avoid a superfluous exposure of substances to air, light and heat, in order to exclude the possibility of alteration. For this purpose all the treatments of materials were carried out in a carbon dioxide atmosphere and in colored vessels.

As pointed out by MacLean (1912), phosphatides are generally contaminated by nitrogenous impurities which are got rid of with difficulty. He has described a method for removing these impurities. But, unfortunately, his method is connected with a considerable loss of substances. After having tried various procedures, I (Sano, 1920) devised finally a method, by means of which we are able to accomplish the complete removal of them without suffering any appreciable loss of phosphatides. The method adopted was to wash out the phosphatides, dissolved in chloroform, by shaking with one per cent sodium chloride. The principal features have been already published, in connection with studies on chylous urine. Choline and purine bases were found to be present in the washings.

The methods of isolating and purifying the substances in question were almost uniform for all kinds of the sperms. The slight differences are given in the experimental part.

In the present work I have been able to demonstrate that the sperm of fish contains a plenty of phosphatides, in agreement with the statement of Miescher (1896) and Mathews (1897), also that lecithin predominates over others. A good deal of the lecithin could be taken up with acetone. Kephalin and sphingomyelin most probably are present in the fish sperm. Further, cerebroside were isolated. They showed a rotatory power differing from that of the brain cerebroside. It is however not yet certain whether they are different cerebroside representing chemical units or impure substances. Finally, the fish sperm contains a considerable amount of cholesterol. 92-95 per cent of it exists in the free form. Oxysterol could not be detected. Also a substance of the nature

of cuorin was obtained. But, according to the works of Levene and Komatsu (1919) and MacLean and Griffiths (1920) the individuality of cuorin is doubtful.

SECTION II. PREPARATION AND SEPARATION OF PHOSPHATIDES.

Extraction with acetone. A portion of 400–700 gm. of the fresh sperm, freed from membranes and connective tissues, was placed in a colored bottle containing carbon dioxide, and 700–800 cc. of pure acetone added. A current of carbon dioxide was passed through the mixture for about 20 minutes, the bottle stoppered and shaken for from four to five hours at room temperature. The tissue was then strained through fine muslin. The operation was repeated five times, until the last extract on evaporation left no appreciable amount of residue. 12 kilos of porgy sperm gave 122 gm. ; 20 kilos of salmon sperm 302 gm. ; 2 kilos of cod sperm 62 gm.

Extraction with ether. The insoluble residue was spread in a thin layer on glass plates, and placed in a bell-jar of an air-pump, provided with a spirally brass tube through which hot water runs. By evacuating and by warming to about 35° the sperms were rapidly freed from the rest of acetone. The sperm powder was then repeatedly extracted with pure ether, until practically nothing further was taken up by the solvent. 12 kilos of porgy sperm gave 6 gm. ; 20 kilos of salmon sperm 1 gm. ; 2 kilos of cod sperm 0.3 gm.

Extraction with hot alcohol. After having been freed from ether in the way similar to that for acetone, the tissue powder was suspended in pure alcohol, boiled under reflux condenser in a water bath for 30 minutes and filtered on suction. The extraction was repeated six or seven times. 12 kilos of porgy sperm gave 20 gm. ; 20 kilos of salmon sperm 46 gm. ; 2 kilos of cod sperm 10 gm.

SECTION III. REMOVAL OF NITROGENOUS IMPURITIES.

The mixed phosphatides were perfectly purified prior to the fractionation. It is a factor playing an important part in the

isolation of phosphatides in a fair degree of purity. The purification after fractionation does not lead to satisfactory results.

In order to remove nitrogenous impurities, the mixed phosphatides were dissolved in pure chloroform. The chloroform solution was transferred into a coloured separatory funnel, a current of carbon dioxide blown in for a few minutes, and then the contents were shaken with one per cent sodium chloride for about 15 minutes. The liquid was then allowed to separate. The liquid sometimes formed an emulsion and would not separate into two layers. In such a case, addition of a little alcohol led to the desired result. The process of washing was continued as long as the salt solution took up coloured matters. After thorough washing the chloroform was distilled off under diminished pressure and the residue taken up in ether. On pouring the ether solution into acetone, phosphatides separated out. Or, in many cases, phosphatides were precipitated directly from the chloroform solution by adding excess of acetone.

The following table containing the results of preliminary experiments carried out with lecithin (E. Merck) shows that this procedure is serviceable.

Times of washing.	0	3	5
Ratio P:N	1:1.28	1:1.11	1:1.04

The salt solution may take up besides impurities also a small amount of phosphatides. But, the phosphatides lost can easily be recovered by evaporating the washings under diminished pressure and extracting the residue with chloroform. So, loss by washing can be reduced to a minimum.

SECTION IV. ACETONE EXTRACT.

All the acetone solutions were combined, evaporated under diminished pressure to dryness and the residue was taken up in

chloroform. After having been purified with sodium chloride, the chloroform solution was evaporated under diminished pressure, the residue again dissolved in pure chloroform, filtered, poured into ten volumes of pure acetone, allowed to stand at room temperature over night and filtered. The crude material was thus divided into a portion soluble in acetone, and an insoluble portion.

I. *The acetone soluble portion. Cholesterol.*

The acetone-soluble fraction was evaporated under diminished pressure, dissolved in a small volume of pure chloroform and poured into a large volume of pure acetone. This operation was repeated at least six times, when it was found that the acetone-chloroform solution remained clear for twenty-four hours at room temperature. The final product was taken up in hot absolute alcohol and kept at 0°. After twenty-four hours a precipitate consisting of thin, transparent plates settled out. The mother liquor from the crystals on concentration and on cooling to 0° gave a second precipitate identical with the first. On further treatment in the same way the second mother liquor gave the third precipitate; then the fourth; and so on.

The last filtrate was evaporated to dryness under diminished pressure, the residue dissolved in a small amount of absolute alcohol, cooled to 0° and filtered. By recrystallization of the insoluble residue from hot alcohol the same crystalline plates were obtained.

All of the crystals thus obtained were collected and recrystallized from hot alcohol. They melted at 148° and gave the Salkowski's and the Liebermann-Burchard's reaction. In all respects they behaved like cholesterol. It was found that there was neither oxysterol nor cholesterol ester admixed.

The filtrates from cholesterol crystals which might have contained still more cholesterol were evaporated under diminished pressure and dried in vacuum over sulphuric acid. A certain amount of the substance was dissolved in ether and made up to

a definite volume. The content of cholesterol and its esters was then determined by the method of Windaus, modified by Mueller (1915), in this ethereal solution. The following table gives the results of estimations.

Sperm.	Free cholesterol in 5 cc. of ethereal solution.	Combined cholesterol in 5 cc. of ethereal solution.
	gm.	gm.
	0.0510	0.0348
Porgy	0.0509	0.0359
	0.1504	0.0847
Salmon	0.1498	0.0849
Codfish	0.0298	0.0077

The amount of cholesterol in the combined form was 7.3 per cent (porgy), resp. 8 per cent (salmon) and 4.1 per cent (cod), of the total cholesterol, including that crystallized out.

Lecithin admixed in this portion.

For the purpose of isolating phosphatides, admixed in the acetone extract, 7.35 gm. of the dried substance above mentioned, obtained from porgy sperm, were dissolved in alcohol and precipitated by means of cadmium chloride. The cadmium chloride compound was four times recrystallized from a mixture of ethyl acetate and 80 per cent ethyl alcohol and then was decomposed according to Bergell (1900). The phosphatides purified in this way were dissolved in ether. The ether was evaporated under diminished pressure, the residue taken up in chloroform and washed once more with sodium chloride. After evaporation of the chloroform the residue was dissolved again in ether and precipitated by excess of acetone. The precipitate of phosphatides was filtered, washed thoroughly with acetone and dried in a coloured vacuum desiccator. The yield was 1.89 gm. The results of analysis were as follows :

0.2000 gm. of substance	gave on fusion	0.0273 gm. $Mg_2P_2O_7$	= 3.81 % P.
0.1772 " " "	" " "	0.0245 " " "	= 3.86 "
0.2266 " " "	required for neutralization	by Kjeldahl	
	2.95 cc. of 0.1 N H_2SO_4		= 1.82 % N.

0.2534 gm of substance required for neutralization by Kjeldahl

3.3 cc. of 0.1 N H_2SO_4 = 1.82 % N.

P : N = 1 : 1.05

The substance, by treatment with nitrous acid after Van Slyke, evolved but an insignificant amount of nitrogen.

Subsequently, the nature of the basic component was studied by the method of Moruzzi (1908). 1.0265 gm. of substance was heated under reflux condenser with 50 cc. of ten per cent sulphuric acid on a water bath. The reaction mixture was evaporated after filtration and dissolved in absolute alcohol. On addition of an alcoholic solution of platinum chloride to the solution a precipitate separated in form of yellow prisms which melted at 234° after recrystallization from hot water. The product was choline platinum chloride. Yield 0.335 gm. The filtrate from the choline platinum chloride was tested for aminoethanol by means of gold chloride. No precipitate was obtained.

From the results of the above observations it is certain that the phosphatide in question was lecithin. And no other phosphatides could be detected in this fraction. The whole of the phosphatides present in the acetone-soluble portion was therefore most probably lecithin.

Next, an attempt was made to determine approximately the amount of lecithin in this fraction. For the purpose 0.8346 gm. of the material was submitted to the phosphorus determination after fusion with fusion mixture in the usual manner. 0.0548 gm. of $Mg_2P_2O_7$ was obtained, corresponding to 0.0153 gm. P = 1.83 per cent P. If the phosphorus content of lecithin be 3.86 per cent, as generally accepted, then 0.3957 gm. of lecithin should have existed.

II. *The acetone-insoluble portion. Mixed phosphatides.*

This fraction which had at first an oily appearance was exhaustively extracted by pure acetone and dried under diminished pressure in the presence of sulphuric acid.

The crude material was dissolved in a small volume of ether and excess of absolute alcohol added. The precipitate thus formed was treated three times more with ether and alcohol as before. The last precipitate was dissolved in a small volume of chloroform.

After having been kept in a stoppered flask at 0° over-night the clear supernatant fluid was decanted and the rest of solvent was removed by the aid of filter paper. The whole process was repeated several times, the quantity of chloroform as solvent being gradually reduced. The majority of the phosphatides dissolved in alcohol.

Lecithin fraction. All the alcoholic solutions were combined and concentrated under diminished pressure. The residue was dissolved in a small amount of pure ether and poured into a large volume of pure acetone. The precipitate thus obtained was purified by the repetition of the procedure. The final product was washed thoroughly with acetone and dried in a coloured vacuum desiccator. This was then repeatedly dissolved in absolute alcohol, cooled to 0° and filtered. The product had physical properties similar to those of lecithin.

0.3086 gm. of substance (porgy)	gave on fusion	0.0422 gm. $Mg_2P_2O_7$	= 3.81% P.
0.5600 " " "	(salmon) " " "	0.0821 " " "	= 4.09 "
0.5784 " " "	" " " " " "	0.0840 " " "	= 4.05 "
0.3250 " " "	(porgy) required for neutralization by Kjeldahl		
		3.95 cc. of 0.1 N H_2SO_4	= 1.9 % N.
0.5894 " " "	(salmon) " " "	" " "	" "
		8.3 cc. of 0.1 N H_2SO_7	= 1.97% N.
0.5908 " " "	" " " " " "	" " "	" "
		8.4 cc. of 0.1 N H_2SO_7	= 1.99% N.

The substance obtained from the porgy sperm gave only an unmeasurable quantity of nitrogen by the Van Slyke's procedure. That from the salmon sperm evolved 0.2 per cent of nitrogen.

Kephalin fraction. All of the sperm tested yielded but a small amount of this fraction; one-twentieth to one-thirtieth of the mixed phosphatides was left behind by the treatment with alcohol. This was dissolved in a small amount of ether and poured into a large volume of absolute alcohol previously cooled to 0°. The precipitate which separated out was filtered and washed with cold alcohol. The process was repeated five times more, in order to remove the last traces of lecithin. The final product which was dried in a colored vacuum desiccator had the following composition.

0.1770 gm.	of substance (porgy)	gave on fusion	0.0208 gm.	$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7=3.27\%$	P.
0.1000	" "	" "	required for neutralization by Kjeldhal		
			1.7 cc. of 0.1 N H_2SO_4	$=2.38\%$	N.
0.1	" "	" "	gave by the aminonitrogen estimation		
			0.7 cc. N at 18° and 758 mm.	$=0.39\%$	N.
0.1	" "	" "	" " " "		
			0.65 cc. N at 18° and 758 mm.	$=0.39\%$	N.

The substance obtained from the porgy sperm was dissolved in a small amount of chloroform, after having been purified once more by shaking with sodium chloride, and poured in portions into absolute alcohol previously warmed to 60° . After standing at 60° for a time the precipitate was filtered, redissolved in chloroform, again precipitated by warm alcohol and filtered at 60° . The filtrate was allowed to stand at 0° over night. The precipitate separated out was filtered, dissolved in a small amount of ether and precipitated by acetone for the second time. The precipitate was filtered, washed with acetone and alcohol and dried.

0.1742 gm. of substance gave on fusion 0.0118 gm. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7=1.89\%$ P.

0.1828 " " " required by Kjeldahl 27 cc of

0.1 N $\text{H}_2\text{SO}_4=2.07\%$ N.

The precipitate which formed on addition of warm alcohol was repeatedly treated by alcohol, then dissolved in chloroform and precipitated by acetone.

0.1454 gm. of substance gave on fusion 0.0176 gm. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7=3.37\%$ P.

0.1536 " " " required by Kjeldahl 3.15 cc. of

0.1 N $\text{H}_2\text{SO}_4=2.87\%$ N.

Owing to the lack of material, no further examination could be performed. It is impossible to make any definite statements from the above results. But there was probably kephalin in this fraction; and, perhaps sphingomyelin, too.

SECTION V. ETHEREAL EXTRACT.

Only a small amount of substance was obtained by the extraction with ether. After having been purified by the treatment with sodium chloride as above described, this extract was separated by

means of acetone into two fractions. The portion soluble in acetone was worked up with the corresponding part obtained from the alcoholic extract.

The acetone-insoluble portion.

The sperms of salmon and codfish gave only a minute quantity of the acetone-insoluble substance. No further examination, therefore, could be carried out.

The fraction obtained from the sperm of porgy, after removal of the adhering acetone, was dissolved in chloroform and excess of alcohol added. A flocculent precipitate was formed. This precipitate was easily soluble in ether, chloroform, petroleum ether and in warm ethyl acetate.

It was dissolved in ether, alcohol added in excess, the resulting precipitate again dissolved in ether and precipitated by acetone. The precipitate was then dissolved in warm ethyl acetate, filtered and allowed to cool in an ice chest. All the procedures were repeated twice. The final product contained the elements phosphorus and nitrogen in ratio of P:N=1,8:1. This composition corresponds to that of so called cuorin. But, as established by Levene and Komatsu and MacLean and Griffiths, cuorin is nothing more than a mixture of kephalin, its fragments and various other substances.

The filtrate from cuorin left on evaporation 0.5 gm of residue which was dissolved in absolute alcohol and allowed to stand at 0° over night. Only a minimum quantity of precipitate settled out, which was filtered off. The alcohol was evaporated under diminished pressure, the residue was redissolved in a small volume of absolute alcohol, allowed to stand at 0°, filtered, and evaporated again. The final residue was treated with ether and acetone as usual and then dried in a coloured vacuum desiccator.

0.1972 gm. of substance gave on fusion 0.0256 gm. $Mg_2P_2O_7$ = 3.62 % P.

0.1821 " " " required by Kjeldahl 2.25 cc. of

0.1 N H_2SO_4 = 1.73 % N.

SECTION VI. ALCOHOL EXTRACT.

The alcoholic solutions were united and left at -10° over night. A yellowish-white flocculent precipitate was formed. The mother liquor was evaporated under diminished pressure, the residue redissolved in a small amount of absolute alcohol and cooled down to -10° . The alcoholic solution which has been completely removed from the insoluble substances by the repetition of the above procedures, was evaporated. The residue was taken up with a small amount of chloroform and purified by shaking with one per cent sodium chloride. It was then divided into two parts, on the basis of the difference of solubility in acetone.

I. *The portion, soluble in cold alcohol and acetone.*

All of the sperms tested yielded only a few grams of this fraction. This was united with the acetone-soluble fraction from the ethereal extract, the amount of which was also very little, and purified by repeatedly dissolving in a small amount of alcohol and evaporating *in vacuo*. It was found that there was, besides phosphatides of unknown composition, some cholesterol in the fraction obtained from the porgy sperm. After the determination carried out according to Windaus-Mueller, about four-fifths of cholesterol existed in the form of the free state,

II. *The portion, soluble in cold alcohol and insoluble in acetone.*

This fraction was dissolved in chloroform, poured into a large volume of absolute alcohol and kept at 0° over night. A small amount of precipitate settled out which was filtered off. The alcohol-chloroform solution was evaporated to a small volume, diluted with excess of ether, filtered, and evaporated to dryness. The residue was extracted with absolute alcohol previously cooled to 0° . The procedure was repeated several times. The final residue was then treated with ether, in order to remove ether-

insoluble substances. The clear ethereal solution was evaporated, the residue was dissolved in chloroform and washed by means of sodium chloride. The product thus obtained was further purified by treatment with a small amount of ether and excess of alcohol.

0.3784 gm. of substance (salmon) gave on fusion		0.0566 gm. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 4.17\%$ P.	
0.3740	" "	" "	0.0562 " " = 4.19 "
0.3542	" "	(cod) " "	0.0484 " " = 3.81 "
0.3754	" "	(salmon) required for neutralization by Kjeldahl	
			6.2 cc. $N \text{ H}_2\text{SO}_4 = 2.31\%$ N.
0.3850	" "	" "	" " "
			6.35 cc. $N \text{ H}_2\text{SO}_4 = 2.31\%$ N.
0.3120	" "	(cod) " "	" " "
			4.15 cc. $N \text{ H}_2\text{SO}_4 = 1.86\%$ N.

The product from the salmon sperm had 15 per cent of nitrogen in form of aminonitrogen; the product from the cod sperm a few per cent.

From the above results it would appear that the product obtained from the cod sperm consisted almost entirely of lecithin, whilst that from the salmon sperm was seemingly a mixture of lecithin and kephalin.

III. *The portion insoluble in cold alcohol.*

This fraction consisted of at least two components which differ from each other in the behaviour towards hot alcohol. One of them was hardly soluble in alcohol, even when treated by warm alcohol, while the other dissolved with ease in warm alcohol. It was found that the former, less in amount, was mixed phosphatides probably contaminated by cerebrosides. The part soluble in hot alcohol appeared to be composed in the main of cerebrosides.

Cerebrosides.

The crude material obtained from the porgy sperm was repeatedly treated with hot alcohol, until the last residue was completely dissolved in hot alcohol. On cooling the final alcoholic solution, a white precipitate separated out. After having been thoroughly washed in cold alcohol the precipitate was extracted

with ether in a Soxhlet's apparatus. For the purpose of further purification the substance was emulsified in hot water, precipitated with acetone and centrifugalized. The process of purification was continued as long as a coloured emulsion resulted. Then, the product was dissolved in hot glacial acetic acid and allowed to cool to 0° and filtered. The filtrate was evaporated to dryness, taken up with hot alcohol, and cooled to 0° . The precipitate was filtered, washed with cold alcohol, and then recrystallized from hot glacial acetic acid. The first and second precipitates, obtained on cooling the solution in glacial acetic acid, were collected and recrystallized from hot glacial acetic acid from six to seven times more. This was then repeatedly recrystallized from hot alcohol. The final product was a snow white powder consisting of rosettes of fine needles. This product was further purified by dissolving in hot pyridine and precipitating with acetone; then recrystallized twice more from hot alcohol.

The material obtained from the salmon sperm was first fractionated by means of pyridine. The cerebrosides fraction was then purified by emulsifying in hot water and subsequent treatment with hot glacial acetic acid. It was finally recrystallized from hot alcohol.

From every kind of the sperms mixed cerebrosides were obtained in this way in form of the white crystalline powder containing no phosphorus. After boiling with 50 volumes of 2 per cent hydrochloric acid for five hours on a water-bath they reduced the Fehling's solution.

These cerebrosides mixtures were divided into two fractions in the following manner. They were dissolved in hot alcohol and allowed to cool to room temperature. The precipitate which formed (Fraction I) was filtered. When the filtrate from the fraction I was allowed further to cool to -10° , the second precipitate settled out (Fraction II).

Fraction I. Yield 1.5 gm. from the porgy sperm; 0.1 gm. from the salmon sperm. It melted to a clear fluid at 234° . The sample from the porgy sperm, dissolved in pyridine, showed the following rotation.

$$[\alpha]_D^{20} = -\frac{0.33 \times 100}{4.338 \times 1} = -7.61^\circ$$

0.1630 gm. of the substance required for neutralization by Kjeldahl

2.8 cc. of 0.1 N $\text{H}_2\text{SO}_4 = 2.4\%$ N.

The product seemed to be still impure, but no further purification could be undertaken, owing to the lack of material.

Fraction II. Only the salmon sperm gave a sufficient quantity for further examinations. Yield was about 6 gm. Its melting point was 220° .

0.1814 gm. of substance required for neutralization by Kjeldahl

2.1 cc. of 0.1 N $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1.62\%$ N.

The optical activity of a solution in pyridine was as follows:

$$[\alpha]_D^{20} = -\frac{1.24 \times 100}{8.59 \times 1} = -14.43^\circ$$

Two further recrystallizations produced no change in the melting point nor in the rotation.

The insoluble residue separated from the cerebrosides crystallized from hot alcohol in the form of needles arranged in star-like formations and appeared to be sphingomyelin. But the yield was too small to make a further study.

I hope to have opportunity to undertake more detailed studies in the cerebrosides of fish sperms.

It will be noted finally that from 55 to 65 per cent of the total fatty matter present in the fish sperm is phosphatides. 15-18 per cent is cholesterol; 20-30 per cent fats; and 1-2 per cent cerebrosides.

Nitrogenous impurities.

The washings of the acetone, ether and alcohol extracts of the porgy sperm (12 kilos) were separately evaporated to small volume and their nitrogen content was determined. The washings of the acetone extract contained 0.185 gm. nitrogen; those of the ether extract 0.013 gm. nitrogen; and those of the alcohol extract 0.709 gm. nitrogen. No trace of phosphorus could be detected in any of them, before or after decomposition. From this fact it is obvious that phosphatides did not pass into the washings. They were

then united, concentrated and precipitated by phosphowolframic acid in the presence of five per cent sulphuric acid. The precipitate of phosphowolframate was filtered on suction, washed with five per cent sulphuric acid, then decomposed by barium hydroxide and worked up for the isolation of purine bases in the usual way, by means of silver nitrate.

Guanine. On treatment with ammonia a minimum quantity of precipitate was obtained.

Adenine. On addition of picric acid a yellow precipitate which was composed of characteristic needles separated out. Recrystallized from hot water, it melted at 278-280°. The Kossel's test was positive.

Xanthine. The xanthine hydrochloride obtained was identified by the xanthine reaction and the Weidel's test.

Hypoxanthine. Characteristic crystals of hypoxanthine picrate were obtained. It melted at 204°.

Further, the presence of choline was ascertained by extracting it with alcohol and precipitating by platinum chloride. The result of the periodide test, too, was positive.

The washings from the salmon sperm (20 kilos) were united, concentrated and Kjeldahlized. The total amount of nitrogen was 3.24 gm.

Purine bases and choline were isolated in the same manner as in the case of porgy sperm.

The washings from the cod sperm were not studied.

REFERENCES.

- Bergell, P. (1900): *Berichte*, **33**, 2584.
Levene, P. A. and Komatsu, S. (1919): *Jl. of Biol. Chem.*, **39**, 91.
MacLean, H. (1912): *Biochem. Jl.*, **6**, 333, 355.
MacLean, H. and Griffiths, W. J. (1920): *Biochem. Jl.*, **14**, 615.
Mathews, A. (1897): *Hoppe-Seyler's Zeitschr.*, **23**, 399.
Miescher, F. (1896): *Schmiedeberg's Archiv*, **37**, 100.
Moruzzi, G. (1908): *Hoppe-Seyler's Zeitschr.*, **35**, 352.
Mueller, H. (1915): *Jl. of Biol. Chem.*, **21**, 24.
Rosenheim, O. and Tebb, C.: *Jl. of Physiol.* **37**, 341 and 348.
Sano, M. (1920): *Tohoku Jl. Exp. Med.*, **1**, 448.

CONTRIBUTION TO THE OPTICAL PROPERTIES OF SPHYNGOMYELIN.

By

MINORU SANO.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tohoku Imperial University, Sendai. Director: Prof. Katsuji Inouye.)

(Received for publication, December 8, 1921.)

Rosenheim and Tebb (1908) were the first to notice the remarkable fact that a solution of protagon in pyridine greatly changes its rotatory power on lowering the temperature. He assumed that the liquid-crystalline state of sphingomyelin has a close relation to this peculiar phenomenon which he called spherorotation. Recently the author has had occasion, in connection with studies on cerebrosides, to have in his possession sphingomyelin in the fairly pure state, and to make some observations on the subject. In this paper there will be presented only data obtained in the preparatory examinations.

The sphingomyelin employed in the present work was obtained from cat's brain. The essential features of the method of preparation was as follows: after removal of acetone and ether soluble substances the brain powder was exhaustedly extracted with boiling alcohol, each extraction lasting 15-20 minutes. On cooling this extract to -10° a mixture of sphingomyelin and cerebrosides separated. This mixture was thoroughly extracted with ether. It was then emulsified in warm water and precipitated by means of acetone. This process was repeated three times more. The crude sphingomyelin was dissolved in hot glacial acetic acid, allowed to cool and the precipitate separated was filtered off. The filtrate was evaporated under diminished pressure, the residue taken up in hot absolute alcohol and the solution allowed to cool to -10° . The precipitate thus formed was again treated with glacial acetic acid as before. This was followed by the recrystallization from

hot absolute alcohol. The final product, after being dried in a vacuum desiccator, was dissolved in pyridine (E. Merck), previously warmed to 45° , and the solution was allowed to cool to room temperature over night. Sphingomyelin thus prepared was further purified by repeated recrystallization from pyridine. Ultimately, the product was recrystallized out of hot alcohol and dried in a vacuum desiccator. It melted at $196-198^{\circ}$ and gave a negative orcin test. Its phosphorus content was 3.78 per cent.

0.123 gm. of the sphingomyelin was dissolved in 10 cc. of pyridine and examined in a polarimeter and a 1 dm. tube at different temperatures, varying from 55° to 30° . The contents of the tube were warmed to the desired temperature by means of water running through the water-jacket. As often as the temperature was varied, it was kept constant for five minutes and then the readings were made. As the source of illumination an ordinary Auer burner was used.

t°	α
55	$+0.17^{\circ}$
50	$+0.17^{\circ}$
45	$+0.17^{\circ}$
40	-0.29°

Solution was tinged with pink. Levorotation increased gradually.

40	(after 5')	-1.46°
"	"	-2.00°
35		-3.85°
"	(after 5')	-3.30°
"	"	-6.02
"	"	-6.35°
33		-7.45°
"	(after 5')	-7.75°

Readings could be continued no longer, owing to the opacity.

Subsequently, in order to furnish more concrete information regarding the transformation temperature, the following experiment was performed. The strength of the solution was not determined.

t°	α
55	$+0.13^{\circ}$
51	$+0.125^{\circ}$

Contribution to the optical properties of sphingomyelin. 19

43	+0.13°
41	+0.13°

The temperature was maintained constant during half an hour; no change occurred in the rotation. However, as the temperature was allowed to fall to 40°, the solution at once became pinkish and showed only a slight dextrorotation which changed gradually into optical inactivity.

40	+0.05°
„ (after 10')	±0

Rotatory power reappeared in the inverse sense and went on increasing.

„ (after 3')	-0.08°
--------------	--------

The temperature was allowed to fall at a rate of 1° in 30 minutes.

39 (45' after the temperature has fallen to 40°)	-0.38°
--	--------

Solution was bluish-violet and slightly opacous.

38	-0.15°
----	--------

Solution was colourless. Precipitate settled down.

37	-0.15°
36	-0.15°

Temperature was allowed to fall faster.

25	-0.15°
----	--------

Rotation varied no longer. A bulky precipitate settled on the bottom of tube. On shaking the tube, and thus equally distributing the precipitate in the fluid, the levorotation returned in a moment to its primitive position of $\alpha = -0.38^\circ$. As the precipitate was allowed to settle, the rotation decreased gradually and finally remained constant at -0.15° . On again disturbing the precipitate and allowing it again to settle the same observations could be repeated at pleasure. Now, as the temperature was raised to 41°, the precipitate disappeared and the original dextrorotation, $\alpha = +0.13^\circ$, was restored.

This result shows that the change of rotation would be produced at about 40°.

Solubility of sphingomyelin in pyridine. The solution used for the above experiments was filtered after standing at room temperature over night. 2 cc. of the filtrate were measured into a weighing-bottle, evaporated and dried in a vacuum desiccator. The residue weighed 0.0036 gm. There was therefore 0.18 gm. of sphingomyelin contained in 100 cc. of the solution.

Next, a solution of sphingomyelin, prepared at 65°, was placed in a water bath of 40° for 30 minutes, and was occasionally

shaken. Then it was filtered on suction. The concentration of sphyn-gomyelin in the clear filtrate was 0.22 gm. per 100 cc.

From the above results it follows that the solubility of sphyn-gomyelin in pyridine at 40° is nearly the same as that at room temperature (20°). Consequently, the change in the sense of the rotation, caused by separating out of the sphyn-gomyelin, should take place above 40°.

REFERENCE.

O. Rosenheim and C. Tebb (1908): *Jl. of Physiol.*, **37**, 341 and 348.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS ELEKTROMOTORISCHE VERHALTEN DER FROSCHHAUT.

I. Die Abhängigkeit des elektromotorischen Verhaltens der Froschhaut von den ableitenden Flüssigkeiten.

VON.

KUNISHIKO HASHIDA.

(Aus dem Physiologischen Laboratorium, Tokyo Kaiserliche Universität, Tokyo).

(Eingegangen am 7. Dezember 1921.)

I. EINLEITUNG.

Seit der Entdeckung der Froschhautströme durch Du Bois-Reymond (S. 11) wurde die zeitliche Veränderlichkeit derselben von mehreren Forschern konstatiert. (Engelmann, Chanoz, Lesser, Bayliss). Neuerdings haben Loeb und Beutner (S. 20) dies ausdrücklich hervorgehoben. Man hat aber diese zeitliche Veränderung noch nicht genügend genau verfolgt, und wir finden hierauf bezügliche Untersuchungen nur bei Lesser. Leider sind seine Untersuchungen zur Erklärung der Verhältnisse nicht genügend umfangreich. Es ist daher sehr wichtig, dass man vor allen Versuchen über das e.m. Verhalten der Froschhaut in erster Linie diese zeitliche Veränderlichkeit und ihre Abhängigkeit von einzelnen Umständen genau untersucht, um zu erkennen, ob die E.M.K. des Froschhautstromes—wie Loeb und Beutner angeben—so veränderlich ist, dass uns die Möglichkeit einer genauen

Die vorliegende und eine bald folgende weitere Arbeit wurden während der Jahre 1915 bis 1918 im gerichtmedizinischen Institute der Universität zu Zürich ausgeführt. Es freut mich, dass ich hier die Gelegenheit bekommen habe, Herrn Direktor Prof. H. Zangger für seine bereitwillige Unterstützung, für seine wichtigen Ratschläge und für die Mühe des Durchlesens des Manuskriptes meinen herzlichsten Dank aussprechen zu können. Die Abhandlung, wie ich sie im Anfang des Jahres 1918 niedergeschrieben hatte, ist durch nichts weiter verändert, als dass sie diesmal möglichst verkürzt wurde. Deshalb wurden auch nur die Literaturen bis zu obigem Datum berücksichtigt.

Untersuchung fehlt, oder ob diese Veränderlichkeit, wie Lesser bemerkt hat, bestimmten Regeln untersteht und einen Verlauf von bestimmtem Typus hat, wenn auch die Ursachen unerklärbar bleiben.

Heutzutage, wo unsere Aufmerksamkeit durch die Arbeiten von Chanoz, Loeb und Beutner und Orbeli auf die Abhängigkeit der bioelektrischen Potentialdifferenz von der Konzentration der Ableitungsflüssigkeit gelenkt worden ist, ist es auch sehr wichtig von demselben Standpunkte aus die Veränderung der E.M.K. beim Wechseln der ableitenden Flüssigkeit zu verfolgen. So war die erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, welche Veränderung der E.M.K. des Froschhautromes sich in bezug auf den Verlauf beim Wechseln der ableitenden Flüssigkeit äussert.

Seit den Untersuchungen von Du Bois-Reymond ist festgestellt, dass die Froschhaut der Sitz der einsteigenden E.M.K. ist, wenn man die Haut beiderseitig mit physiologischer Kochsalzlösung oder Ringer'scher Lösung ableitet. Jedoch ist die Richtung dieser E.M.K. nicht unter allen Bedingungen immer dieselbe. Galeotti (S. 548), Chanoz (S. 809) u. Orbeli (S. 351) haben gezeigt, dass die Stromrichtung nicht nur von der Art der Ableitungsflüssigkeit, sondern auch von der Konzentration derselben abhängig ist. Die Angaben sind aber nicht ganz exakt, weil dabei die Diffusionspotentiale zwischen der ableitenden Flüssigkeit und der eisen Elektrode nicht berücksichtigt worden sind.

Den Zusammenhang zwischen den Grössen der bioelektrischen Potentialdifferenzen und den Konzentrationen der ableitenden Flüssigkeit hat Engelmann (S. 112) zuerst und nachher Orbeli (S. 350) an Fröschen untersucht. Beide kamen aber zu widersprechenden Resultaten, was wohl auf die Unterschiede der Versuchsmethodik zurückzuführen ist. Genaue hierauf bezügliche Untersuchungen haben Loeb und Beutner erst neuerdings an pflanzlichen Geweben unternommen. Sie fanden eine regelmässige Beziehung zwischen obigen beiden Grössen, nämlich dass die ableitenden Lösungen auf die E.M.K. desto mehr positivierend

(aufsteigend) wirken, je verdünnter sie sind. Die Zunahme der Potentialdifferenz, welche durch Konzentrationszunahme der Ableitungsflüssigkeit im negativierenden Sinne hervorgerufen wird, wird immer kleiner mit der Konzentration, um zuletzt asymptotisch einen Grenzwert zu erreichen. Beide Forscher haben gleichartige Untersuchungen an der Froschhaut mit Ringer'scher Lösung ausgeführt und fanden, dass eine ähnliche Beziehung auch hier bei den verdünnten Lösungen bemerkbar ist; aber merkwürdigerweise wirken die konzentrierten Lösungen weniger negativierend, so dass bei einer gewissen Konzentrationsgrenze die Richtung der Veränderung der Potentialdifferenz umkehrt. Also zeigt bei der Froschhaut die Potentialdifferenz-Log (Konzentration)-Kurve einen *Extrempunkt*. Es ist sehr wichtig zu untersuchen, ob eine solche Eigentümlichkeit des e.m. Verhaltens der Froschhaut nicht nur bei Ringer'scher Lösung, sondern auch bei anderen Salzlösungen zu finden ist.

Die genaue Kenntnis des e. m. Verhaltens der ruhenden Froschhaut ist die Grundlage für die weiteren physiologischen Untersuchungen, besonders für die Untersuchungen über das Verhalten der tätigen Froschhaut unter verschiedenen Umständen. Leider steht aber diese Grundlage noch nicht fest. Der Hauptzweck der vorliegenden Arbeit ist, weitere Unterlagen dafür zu schaffen.

II. ALLGEMEINE VERSUCHSMETHODIK.

Ein kleines Stück einer eben sorgfältig ausgeschnittenen Froschhaut wurde am einen Ende eines durchlochten Reagenzglases von ca. 5 cm Länge und von ca. 1 cm Durchmesser mit Baumwollfaden fest angebunden und in dem Masse entspannt, dass eine etwaige Schädigung der Haut durch Überspannung vermieden wurde. Die Hautoberfläche wurde dabei immer nach aussen gerichtet. Das Präparat wurde mit einer kleinen Menge Ringer'scher Lösung gefüllt, in toto mit der angebundenen Haut in die zu untersuchende Flüssigkeit eingetaucht und mit den Ringer-Kalomel-

Elektroden zum Kapillarelektrometer abgeleitet. Die eine Elektrode kam mit der Ringer'schen Lösung in dem Reagenzglas zur Berührung, während die andere in die äussere ableitende Flüssigkeit tauchte.

Dabei wurde die Niveaufäche innerhalb und ausserhalb der Glasröhre möglichst in gleicher Höhe gehalten, um das Hinein-oder Hinausstülpen der angebundenen Haut zu vermeiden. So schwebte das angebundene Hautstück zwischen den beiderseitigen Flüssigkeiten, da die Haut in entspanntem Zustande angebunden war.

Beim Wechseln der äusseren Flüssigkeit stülpt sich die Haut infolge des hydrostatischen Druckes nach unten. Die Haut könnte so mechanisch gereizt werden. Um dieses unvermeidliche Herunterstülpen der Haut möglichst zu verringern, habe ich nur eine solche Menge der inneren Flüssigkeit gebraucht, dass die Elektrodenspitze eben in die Flüssigkeit tauchte, aber trotzdem niemals mit der Hautinnenfläche in Berührung kam. Das letztere war eine Vorsichtsmassregel zur Vermeidung etwaiger mechanischer Reizung der Hautinnenfläche durch die Elektrodenspitze, die beim Wechseln der äusseren Flüssigkeit ohne diese Vorsicht sich sonst einmal von der Haut hätte entfernen und dann dieselbe wieder hätte berühren können.

Die äussere zu untersuchende Flüssigkeit war in einem weiteren Gefässe enthalten und wurde folgendermassen gewechselt: die eben angewendete Flüssigkeit wurde durch Senken des Gefässes langsam heruntergebracht, und ein anderes gleichgrosses Gefäss mit einer gleichen Menge einer anderen Flüssigkeit wurde wieder langsam in die vorige Lage hinaufgehoben.

Zu diesem Zweck wurde das Reagenzglas in bestimmter Höhe senkrecht an einem Stativ festgehalten, und das Gefäss für die äussere Flüssigkeit wurde auf eine leicht verschiebbare Unterlage gestellt. Durch diese Manipulation konnte ich mechanische Reizungen wohl ziemlich vermeiden.

Als äussere Gefässe wurden Glasschalen von ca. 70 ccm Inhalt und ca. 5 cm Durchmesser gebraucht. So betrug die Menge der äusseren Flüssigkeit immer ungefähr 60 ccm. Orbeli (s. 345) hat eine noch grössere Menge Flüssigkeit zur Ableitung angewendet, um konstante Untersuchungsergebnisse zu erreichen. Aber für meine Untersuchungen genügte eine kleinere Menge, da die gebrauchten Hautstücke viel kleiner waren als bei den Untersuchungen von Orbeli.

Die E.M.K. wurde nach *Kompensationsmethode* gemessen; dabei wurde so viel Vorschaltswiderstand eingeschaltet, dass 1mm des Rheokords 0.1mV entsprach.

Als Vergleichsquelle wurde ein Bleiakkumulator gebraucht, dessen Klemmspan-

nung öfters mit dem Millivoltmeter im Nebenkreis beobachtet wurde. Da er ziemlich lange eine konstante Klemmspannung behielt, so dass während einer Versuchsreihe niemals Herabsinken der Spannung um 1mV vorkam, und da die Hauptaufgabe meiner Untersuchungen eine vergleichende Messung war, so konnte dieser Akkumulator für meine Zwecke genügen. Dagegen wurde der Rheochord genau kalibriert, weil besondere Genauigkeit der zu vergleichenden Zahlenwerte sehr wünschenswert war.

Als Nullinstrument habe ich das Kapillarelektrometer von Köhler (Modell III) gebraucht. Das Instrument war so empfindlich, dass es bei minimaler Verschiebung des Kontaktes einen deutlich merkbaren Ausschlag gab, wenn man das Reflexbild des mit einer Glühlampe schräg beleuchteten Quecksilbermeniskus durch das Mikroskop beobachtete.* So konnte ich mit Sicherheit eine Differenz von 0.05mV konstant und eindeutig abmessen. Es wurde jede Minute eine Messung ausgeführt (eine einzelne Beobachtung beansprucht höchstens 10 Sekunden, wenn man schnell kompensiert.)

III. DIE ABHÄNGIGKEIT DES E.M. VERHALTENS DER FROSCHAUT VON DER KONZENTRATION DER VERSCHIEDENEN SALZLÖSUNGEN.

A. Methodik

Hier wurden verschiedene Alkalichloride, nämlich KCl, CsCl, RbCl, NH_4Cl , LiCl, NaCl, und verschiedene Na-Salze, und zwar NaCl, NaBr, NaJ, NaNO_3 , NaSCN, Na_2SO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 , angewendet. Die höchste Konzentration der Lösungen war 0.1m oder 0.12m. Von dieser Konzentration ab wurden Lösungen der verschiedenen Konzentrationen bis zu 0.1m/200 resp. 0.12m/256 durch 4- oder 5-fache Verdünnung hergestellt. Die Versuche wurden in diesem Bereiche folgenderweise ausgeführt: das Präparat wurde zuerst in destilliertes Wasser eingetaucht, dann kam die verdünnteste Lösung zur Anwendung, darauf die 4 oder 5 mal konzentriertere Lösung u.s.w. bis hinauf zu Lösungen von 0.1m resp. 0.12m. Dass die Experimente mit verdünnter Lösung angefangen wurden, geschah weil ich bei provisorischen Versuchen beobachtet hatte, dass die Salzlösungen die Beschaffenheit der Froschhaut irgendwie zu modifizieren scheinen. Wenn dies der Fall wäre, sollte eine solche "Modifikation" wohl bei geringeren Konzentrationen kleiner sein als bei grösseren, und infolgedessen müsste die "Modifikation" während einer ganzen Versuchsreihe viel kleiner bei Anwendung der Lösungen in der aufsteigenden Konzentrationsreihe als in der absteigenden sein. Es wäre sehr wünschenswert, diese Versuche nach beiden Richtungen weiter auszudehnen.

*Das gewöhnliche Schattenbild des Meniskus ist bei solchen Instrumenten nicht genügend scharf. Dagegen ist das Reflexbild sehr scharf und deutlich, so dass man schon eine minimale Bewegung des Meniskus ohne Mühe beobachten kann.

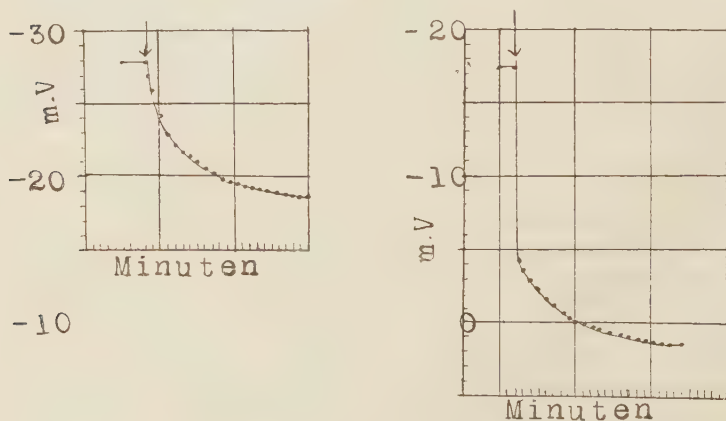
B. *Ergebnisse der Versuche* (Vgl. Tafel I-III)

a) Beim Wechseln der äusseren ableitenden Lösung eines Salzes von bestimmter Konzentration mit einer Lösung desselben Salzes von anderer Konzentration tritt eine Veränderung der E.M.K. des Systems ein. Diese Veränderungen, welche (den Fall von LiCl ausgenommen) in ziemlich einfachen regelmässigen Kurven verlaufen, erreichen ihren endgültigen Wert erst nach ziemlich langer Zeit. Auch im Falle von LiCl, wo der Verlauf merkbare kleine, unregelmässige Schwankungen zeigt, ist der Gang des Verlaufes im grossen und ganzen mit demjenigen in anderen Fällen vergleichbar. Kurz, die Veränderungen der E. M. K. sind beim Wechseln der Ableitungsflüssigkeit regelmässig.

b) Es lassen sich hier dreierlei Fälle der zeitlichen Verläufe unterscheiden :

1) Der Fall, wo die E.M.K. anfangs mit grösser und dann mit immer kleiner werdender Geschwindigkeit allmählich zunimmt, wie man z. B. in Fig. 1 sieht.

Fig. 1.



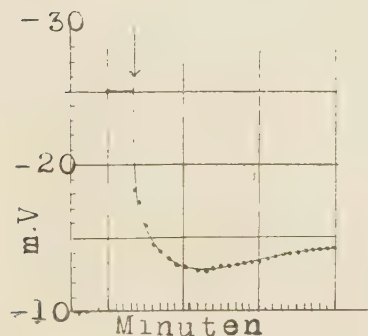
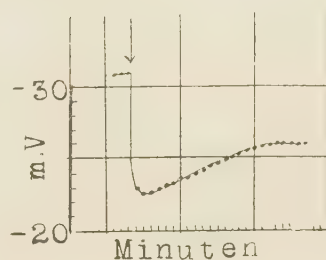
Vom Wasser in $0.12m \times 1/256$ NaCl

Von $0.12m \times 1/256$ in $\times 1/64$ Na_2SO_4

N.B. In den obigen und folgenden Textfiguren bedeuten die — Zeichen die Positivität der Hautoberfläche und die Pfeile zu Anfang der Kurve den Zeitpunkt, wo das Wechseln der Ableitungsflüssigkeit vollendet ist. Die Punkte stellen die gewonnenen Daten dar.

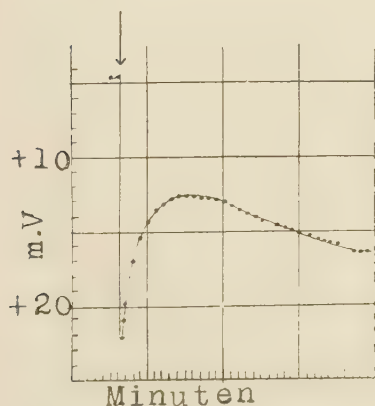
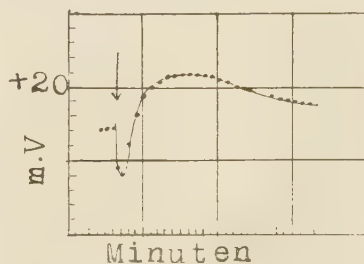
2) Der Fall, wo die E.M.K., anfangs ähnlich wie im Falle 1) verläuft, aber nachdem sie ihren Maximalwert erreicht hat wieder mit anfangs grösserer, später kleinerer Geschwindigkeit abnimmt, um endlich ihren endgültigen Wert zu erreichen, wie z.B. in Fig. 2 gezeigt ist:

Fig. 2.


 Vom Wasser in $0.12m \times 1/256$ NaJ

 Vom $0.12m \times 1/256$ in $\times 1/64$ NH Cl

Der Fall 1) scheint uns ein unvollständiges Anfangsstück des Falles 2) zu sein, so dass man vielleicht auch im Falle 1) die Umkehrung der Verlaufsrichtung am Schluss des Verlaufes finden würde, wenn man den Verlauf noch weiter verfolgte. Daher wollen wir diese zwei Fälle als demselben Typus angehörend betrachten und sie den Verlauf von I. Typus nennen.

Fig. 3.


 Von $0.12m \times 1/64$ in $\times 1/16$ NaH_2PO_4

 Von $0.12m \times 1/2$ in $\times 1/1$ NaJ

3) Der Fall, wo die E.M.K. anfangs mit sehr grosser Geschwindigkeit schnell den Maximalwert erreicht, um dann im umgekehrten Sinne wie der Fall von I. Typus zu verlaufen. Den Fall wollen wir den Verlauf von II. Typus nennen. Es werden in vorangehenden Figuren die Beispiele dafür wiedergegeben :

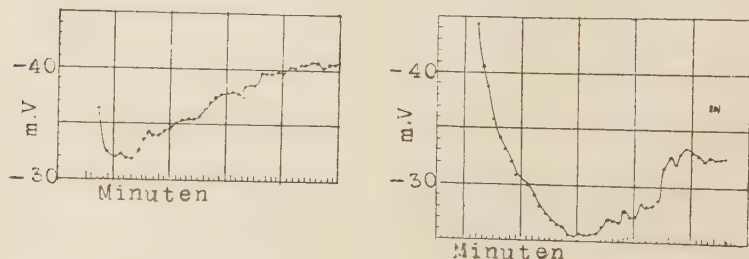
Die Aenderung der E.M.K. in umgekehrte Richtung am Schlusse des Verlaufes ist beim I. Typus immer kleiner als die eigentliche Veränderung, so dass der endgültige Wert immer grösser als der der vorigen Veränderung bleibt. Beim II. Typus ist das Verhältnis insofern ein anderes, als die Veränderung im umgekehrten Sinne entweder grösser oder beinahe gleich oder kleiner ist als die anfängliche Veränderung, so dass die endgültige Lage der Kurve entweder tiefer oder beinahe gleich oder höher steht als das Anfangsniveau.

Den I. Typus findet man bei kleineren Konzentrationen der Ableitungsflüssigkeit; dagegen tritt der II. Typus erst bei grösseren Konzentrationen zutage. Die Konzentrationsgrenze, wo der Verlauf vom I. Typus in den II. Typus übergeht, liegt bei allen Salzen ungefähr in demselben Bereiche, nämlich zwischen 0.03 m bis 0.06 m (s. Tafel IV VI). Diese Grenzkonzentration ist bei den binären Salzen grösser als bei den ternären. Daraus kann man schliessen, dass dieser Unterschied der Verlaufstypen hauptsächlich mit der Konzentration zusammenhängt, und dass die andern Faktoren dabei nur wenig Einfluss ausüben.

c) Beim Ableiten mit destilliertem Wasser verhält sich die Oberfläche der Froschhaut immer positiv der Innenfläche gegenüber, d.h. die E.M.K. des Systems ist innerhalb der Haut von Innen nach Aussen gerichtet.

Es ist bemerkenswert, dass die E.M.K. bei der Erneuerung des ableitenden Wassers von neuem ein ziemlich beträchtliches Ansteigen im Sinne der dabei herrschenden Richtung der E.M.K. zeigt, um dann wieder schnell abzunehmen und allmählich einen endgültigen Wert zu erreichen. Dieses Ansteigen wiederholt sich bei wiederholten Erneuerungen des Wassers. Es sind drei Möglichkeiten denkbar : 1) irgend eine Art Salz, das an der Hautoberfläche anhaftet, wird allmählich weggespült, oder 2) eine kleine Menge Salz tritt durch die Sekretion heraus, oder

Fig. 4.



3) die innere Flüssigkeit diffundiert durch die Haut, insbesondere durch die gebundene Hautstelle. Jedenfalls muss diese heraustretende Salzmenge sehr klein sein.*

In den meisten Fällen war der zeitliche Verlauf bei der Ableitung mit Wasser sehr unregelmässig, wie in vorangehenden Figuren (Fig. 4) gezeigt ist.

d) Obwohl natürlich graduell verschieden, wirken alle Alkalisalze negativierend auf die Froschhautoberfläche. Bis zu einer gewissen Konzentrationsgrenze wirken sie desto stärker negativierend, je konzentrierter die Lösung ist.

So nimmt die E.M.K. des Systems im Sinne der einsteigenden Richtung bis zu der betreffenden Grenze mit der Konzentration zu: wenn man also das Experiment mit destilliertem Wasser anfängt und nacheinander immer konzentriertere Lösungen zur Ableitung anwendet, verschwindet die Positivität der Hautoberfläche bei einer gewissen Konzentration der Lösung, um bei weiterer Konzentrierung der Ableitungsflüssigkeit in die Negativität überzugehen, d.h. die E.M.K. im einsteigenden Sinne erscheinen zu lassen. Diese Grenzkonzentration ist je nach den Arten des Salzes verschieden. (s. Tafel IV VI.)

Wenn aber die Konzentration der Ableitungsflüssigkeit eine gewisse Grenze überschreitet, tritt Richtungswechsel in der Veränderung der E.M.K. auf. Mit anderen Worten: die Konzentrationszunahme wirkt von einer gewissen Konzentration an wieder weniger negativierend. Diese Wirkung der konzentrierten Lösung äussert sich in demselben Bereiche, wo der Uebergang des Verlaufstypus auftritt.

Diese positivierende Wirkung ist viel kleiner als die anfängliche negativierende, so dass die Hautoberfläche im Bereiche meiner Untersuchung in den meisten Fällen immer negativ der Innenfläche gegenüber bleibt: nur in einigen Fällen war die E.M.K. bei konzentrierten Lösungen aussteigend. Aber diese Positivität der Hautoberfläche war sehr klein.

e) Die quantitative Beziehung zwischen den Konzentrationen und den Grössen der denselben entsprechenden E. M. K.

Bei meinen Versuchen sind die endgültigen Werte der E.M.K. nicht in allen Fällen beobachtet worden. In solchen Fällen habe ich die wahrscheinlichen Werte extrapoliert, indem ich die Verhältnisse der zwei sich anschliessenden Versuchsreihen und die Resultate aller anderen Versuche mit berücksichtigt habe. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

*Eine genaue Untersuchung darüber wird bald mitgeteilt.

1) *KCl*

0.0005m	—	-40.75	-47.05	-30.5
0.001m	-18.5	-38.25	-42.7	-21.55
0.002m	—	-39.25	-38.5	—
0.0025m	-18.5	—	—	—
0.004m	—	-27.2	-29.85	-11.0
0.005m	-11.6	—	—	—
0.0075m	-9.75	—	—	—
0.008m	—	-18.5	-23.85	—
0.01m	-7.15	—	—	—
0.016m	—	-9.95	-13.3	-3.9
0.32m	—	-0.05	-5.7	-1.15
0.06m	+3.0	—	—	—
0.064m	—	+5.5	+0.75	+5.15
0.12m	+1.2	+4.5	+1.85	+4.05

2) *RbCl* 0.12m

1/256	-19.9	-24.6
1/64	-15.8	-21.05
1/16	-6.7	-2.1
1/4	-1.45	-0.7
1/1	+2.05	+2.05

3) *CsCl* 0.12m

	-38.25
	-29.2
	-13.3
	-6.3
	+1.5

4) *NH₄Cl* 0.12m

1/256	-24.25	-24.9	-31.0
1/64	-19.3	-24.5	-25.95
1/16	-7.45	-12.3	-11.7
1/4	+0.75	-1.85	-2.15
1/1	+0.7	-1.5	+1.75

5) *LiCl*

0.0005m	-22.8	-18.2	-35.75
0.001m	-19.15	—	—
0.002m	-18.3	-16.8	-24.55
0.004m	-5.35	—	—
0.008m	-3.65	-6.0	-3.0
0.016m	+14.0	—	—
0.032m	—	+32.0	+28.5
0.12m	—	+44.6	+42.2

6) *NaCl* 0.12m

1/256	-8.8	-19.0	+1.0
1/64	+10.6	+6.8	+20.65
1/16	+41.0	+37.25	+46.0
1/4	+59.45	+45.05	+58.6
1/1	+52.5*	+33.05	+53.0

7) NaJ 0.12m				
1/256	—14.3	—31.1	—25.6	
1/64	+ 3.8	—15.25	—23.0	
1/16	+33.25	+ 9.0	— 4.65	
1/4	+63.25	+25.0	+18.1	
1/2	—	+21.35	—	
1/1	+49.75*	+21.5	+29.05	
8) $NaBr$ 0.12m				
1/256	—26.75	—23.05	—27.15	
1/64	— 5.0	— 0.6	— 4.75	
1/16	+27.0	+29.65*	+25.2	
1/4	+51.6	+55.6	+54.3	
1/1	+44.2*	+49.75*	+61.75	
9) $NaSCN$ 0.12m				
1/256	—34.35	—37.55	—42.0	
1/64	— 8.0	— 0.15	—27.85	
1/16	+24.45	+26.3	— 0.25	
1/4	+48.65	+47.7	+22.75	
1/1	+47.75	+54.75	+22.8	
10) $NaNO_3$				
0.0005m	—32.05	—14.6		
0.002m	— 7.5	+22.8		
0.008m	+33.8	+59.2		
0.032m	+56.05	+83.2		
0.12m	+58.95	+88.35		
11) Na_2SO_4 0.12m				
1/256	—17.4	—20.45	—16.5	—23.0
1/64	+ 1.6	— 8.4	—11.8	— 2.8
1/16	+27.0	+ 5.75	+38.0	+28.35
1/4	+44.05	+16.0	+48.0	+50.35
1/1	+37.55	+ 7.8	+30.0	+54.9
12) NaH_2PO_4 0.12m				
1/256	—24.8	— 2.05	— 8.25	
1/64	—11.1	— 8.95	— 4.6	
1/16	+ 8.0	+25.5	+16.5	
1/4	+ 2.55	+20.96	+15.3	
1/1	+ 9.9	—	+18.9*	
13) Na_2HPO_4 0.12m				
1/256	—14.0	— 1.8	— 0.65	
1/64	+20.0	+24.5	+29.15	

1/16	+45.6	+50.25	+48.5
1/4	+47.65	+58.65	+50.0
1/1	+27.4	+35.0	+32.0

14) Na_3PO_4 0.10m

1/256	+12.45
1/64	+27.9
1/16	— 9.8
1/4	— 3.1
1/1	— 0.3

15) K_2HPO_3 0.12m

1/256	—12.95
1/64	—11.0
1/16	— 7.25
1/4	+20.35
1/1	+19.85

N.B. 1) Die Einheit der angegebenen Zahlen ist 1mV.

2) 0.12m resp. 0.10m neben dem Namen des Salzes bedeutet die Konzentration der Stammlösung. Die Brüche in der ersten Kolonne bezeichnen die Verdünnungsgrade dieser Stammlösungen.

3) Die Zahlenwerte sind folgenderweise abgerundet worden:

0.01—0.02 vernachlässigt,
 0.03—0.07 gleich 0.05 gesetzt,
 0.08—0.12 gleich 0.1 gesetzt.

4) Die mit * versehenen Zahlen sind nicht ganz exakt.

5) Das Zeichen+ bedeutet die einsteigende, und das Zeichen—die aussteigende Richtung.

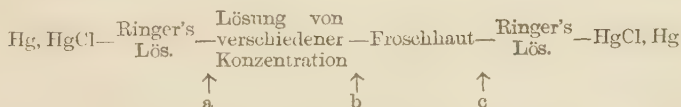
Aus der Tabelle sieht man, dass die E.M.K.K., die den gleichen Konzentrationen entsprechen, auch bei demselben Salze je nach dem Individuum verschieden sind. Solche individuellen Verschiedenheiten der experimentellen Resultate sind in physiologischen Untersuchungen ganz gewöhnlich. Sie sind sogar im voraus zu erwarten. Aber erst nachdem wir von den individuellen Einflüssen qualitativ und quantitativ Kenntnis erhalten haben, können wir die bezweckten quantitativen Beziehungen im wirklichen Sinne des Wortes herausholen. Wir wollen uns daher vorläufig—unter der Annahme, dass diese individuellen Einflüsse nicht qualitativ, sondern nur quantitativ seien—damit begnügen, aus den gewonnenen Zahlenwerten die wahrscheinlicheren Durchschnittswerte auszurechnen. Allerdings sind bei meinen Untersuchungen die Verdünnungsgrade der Lösungen nicht in allen Fällen dieselben, und wir können deshalb nicht ohne weiteres (auch nicht bei demselben Salze) einen arithmetischen Durchschnitt für die der betreffenden Konzentration entsprechenden E.M.K. ausrechnen. Auch in dem Falle, wo die Verdünnungsgrade dieselben sind, fragt es sich, ob die erhaltenen Zahlenwerte wirklich die wahrscheinlichsten sind oder nicht. Wenn aber eine gesetzmässige Beziehung zwischen den Konzentrationen und den denselben entsprechenden E.M.K.K. wirklich vorhanden wäre, so sollte man ein anschauliches Bild davon bekommen, indem man die Versuchsergebnisse graphisch darstellt. Da die eine und einzige voraussetzbare Beziehung die logarithmische Abhängigkeit der E.M.K. von der Konzentration ist, habe ich zuerst die erhaltenen Zahlenresultate auf einfach logarithmischem Papier punktiert. Obwohl man dabei keine vorausgesetzte

gerade Linie erhält, so kann man doch viele Kurven bekommen, welche die erhaltenen Zahlenwerte sehr glatt verbinden und mit einander sehr ähnlich verlaufen. In den Fällen, wo keine glatte Verbindung möglich war, habe ich die nächst wahrscheinliche Kurve konstruiert, d.h. eine solche, die möglichst viele der gemessenen Zahlenwerte glatt verbindet und gleichzeitig anderen, wirklich erhaltenen Kurven möglichst ähnlich ist. Aus solchen wirklich erhaltenen oder wahrscheinlichen Kurven habe ich die E.M.K.K., welche derselben Konzentration entsprechen, ausgerechnet, und erst danach sind die Durchschnittswerte, die in folgender Tabelle zusammengestellt und in den Tafeln IV IV mit ausgezogenen Linien graphisch dargestellt sind, ausgerechnet worden.

0.12m x	1/256	1/64	1/16	1/4	1/1
KCl	-31.67	-25.79	-15.25	- 1.77	+ 2.88
RbCl	-22.8	-17.63	- 5.23	+ 0.5	- 1.53
CsCl	-36.3	-30.5	-15.0	- 3.75	+ 1.5
NH ₄ Cl	-27.42	-22.42	-10.88	- 1.02	+ 0.23
LiCl	-26.37	-18.47	+ 2.12	+27.4	+39.85
NaCl	- 8.93	-12.63	+41.67	+54.37	+46.25
NaBr	-25.65	- 3.37	+26.98	+53.77	+53.08
NaJ	-26.78	-11.42	+12.58	+35.42	+36.17
NaSCN	-35.08	-12.65	+17.98	+39.7	+41.77
NaNO ₃	-22.56	+ 5.45	+44.75	+68.85	+73.65
Na ₂ SO ₄	-19.15	+ 0.85	+24.9	+36.61	+32.56
NaH ₂ PO ₄	-13.42	+ 1.2	+12.78	+12.53	+ 1.33
Na ₂ HPO ₄	- 5.07	+23.8	+48.5	+50.37	+31.33
Na ₃ PO ₄	+12.45	+27.9	- 9.8	- 3.1	- 0.3
K ₂ HPO ₄	-16.35	- 7.25	+ 7.6	+20.0	+20.2

Um die quantitative Beziehung an der Haut selbst zu beurteilen, müssen wir die Diffusionspotentiale, die zwischen den ableitenden Flüssigkeiten und Elektrode zu erwarten sind, in Betracht ziehen.

Das System unserer Versuche besteht, schematisch dargestellt, aus der folgenden Kette :



Wir müssen also annehmen, dass die gemessene E.M.K. des Systems, π , aus einer algebraischen Summe der drei Potentialdifferenzen besteht, die an der Flüssigkeitsgrenze a und an den Phasengrenzen b und c auftreten, d.h.

$$\pi = \pi_a + \pi_b + \pi_c$$

oder

$$\frac{U_a \xi - U_b}{V_a \xi - V_b} = \frac{\log \frac{C_b}{C_a} - \log \xi}{\log \frac{C_b}{C_a} + \log \xi}$$

oder

$$\frac{U_a \xi - U_b}{V_a \xi - V_b} + 1 = \frac{2 \log \frac{C_b}{C_a}}{\log \frac{C_b}{C_a} + \log \xi} \quad (1)$$

Die Zahlenwerte des linken Gliedes der letzten Formel verändern sich sehr langsam mit der Veränderung von ξ , während das rechte Glied dabei eine schnelle Veränderung erleidet. So kann man nach einigemal wiederholten Versuchen einen annähernden Wert für ξ erhalten, um endlich aus diesem Wert den ziemlich genauen Wert von ξ auszurechnen.

Wenn die Lösungen nur ein gemeinsames Kation enthalten, so ergibt sich

$$\frac{U_a - U_b \xi}{V_a - V_b \xi} + 1 = \frac{2 \log \frac{C_b}{C_a}}{\log \frac{C_b}{C_a} + \log \xi} \quad (2)$$

Die Lösungen, die bei unseren Versuchen zur Anwendung kamen, sind nicht vollständig dissoziiert. So wurde die Ionenkonzentration einzelner Lösungskomponenten aus der analytischen Konzentration und dem Dissoziationsgrade (aus den Leitungsfähigkeiten) berechnet (bei den zweiwertigen Ionen wurde die Ionenkonzentration einfach verdoppelt). Dass eine solche Folgerung sehr plausibel ist, wurde schon von Tower gezeigt, und sie kann für unseren Zweck genügen, da unsere Messungen von vornherein qualitativer Natur sind. Um die π_a -werte zwischen Ringer'scher Lösung und verschiedenen angewendeten Na-Salzlösungen zu berechnen, wurde die Ringer'sche Lösung als einfache NaCl-Lösung von derselben Ionenkonzentration betrachtet und die Formel (2) kam ohne weiteres zur Anwendung. Die ausgerechneten Werte der Diffusionspotentialdifferenzen sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

0.12m x	1/1	1/4	1/16	1/64	1/256
KCl	+4.1	+8.2	+13.5	+19.5	+26.0
RbCl	+4.6	+8.4	+13.5	+19.7	+26.0
NH ₄ Cl	+4.1	+8.2	+13.4	+19.5	+26.0
LiCl	-2.7	+5.0	+12.5	+19.2	+26.0
NaCl	+0.0	+6.3	+12.8	+19.3	+26.0
NaBr	+0.7	+6.0	+12.6	+19.3	+25.9
NaSCN	+0.5	+7.4	+13.3	+19.6	+26.1
NaNO ₃	+0.5	+6.8	+13.0	+19.2	+25.9
Na ₂ SO ₄	-3.4	+3.4	+9.7	+15.7	+22.7

N.B. 1) Die Konzentration der Stammlösung: 0.12m

2) Die Einheit der Potentialdifferenz: 1mV

3) Die E.M.K. ist in den meisten Fällen innerhalb der Kette von der betreffenden Lösung nach der Ringer'schen gerichtet. Diese Richtung ist mit + Zeichen versehen. Das—Zeichen bedeutet die entgegengesetzte Richtung.

Indem man die Zahlenwerte, die in der Tabelle auf s. 33 zusammengestellt sind, um die eben erhaltenen Werte des Diffusionspotentials korrigiert, erhält man die folgenden Resultate, die in Tafel IV—VI mit gestrichenen Linien graphisch dargestellt sind.*

	1/256	1/64	1/16	1/4	1/1
KCl	— 5.67	— 6.43	— 1.75	+ 6.43	+ 6.98
RbCl	+ 3.2	+ 2.07	+ 8.27	+ 8.9	+ 3.63
CsCl	—10.3	—10.8	— 1.5	+ 4.65	+ 7.1
NH ₄ Cl	— 1.42	— 2.92	+ 2.52	+ 7.18	+ 4.35
LiCl	— 0.37	+ 0.75	+14.63	+32.4	+37.55
NaCl	+17.07	+31.92	+54.47	+60.67	+46.25
NaBr	— 0.25	+15.93	+39.48	+59.77	+53.68
NaJ	— 0.88	+ 7.88	+25.08	+41.4	+36.77
NaSCN	— 8.98	+ 6.95	+31.28	+47.1	+42.27
NaNO ₃	+ 2.75	+24.65	+57.75	+75.05	+74.15
Na ₂ SO ₄	+ 3.55	+16.65	+34.65	+43.01	+29.16

N.B. Bei der Korrektur wurde angenommen



Daraus ergibt sich, dass die logarithmische Abhängigkeit der E.M.K. von der Konzentration und die asymptotische Annäherung der Potentialdifferenzen zu einem Grenzwert mit der Konzentrationszunahme—wie sie Loeb und Beutner als ein Charakteristikum der bioelektrischen Potentialdifferenzen gezeigt haben—hier nicht zu sehen sind, sondern dass alle Kurven einen Extrempunkt haben, und zwar ein Maximum im Sinne der Negativität der Hautoberfläche.

Es ergibt sich, dass man die Alkalisalze, wenigstens Alkalichloride, in bezug auf die negativierende Wirkung in zwei Gruppen einteilen kann. *Zur ersten Gruppe gehören KCl, CsCl, NH₄Cl, die verhältnismässig kleinere Wirkung haben. NaCl und LiCl, die dagegen stärkere Wirkung zeigen, bilden die andere Gruppe.*

*Bei den Phosphaten konnte ich diese Korrektur nicht ausführen, da genaue Angaben der Dissoziationsgrade bei verschiedenen Konzentrationen derselben Salze mir fehlten.

Aus der Tafel IV kann man auch die Anordnung der negativierenden Wirkung der Alkalisalze gut überschauen, und zwar



Was die Resultate bei den verschiedenen Na-Salzen anbetrifft, so sieht man aus der Tafel V zum grossen Unterschiede von den ersten Versuchsgruppen, dass alle Kurven sich mit einander kreuzen, so dass man die Wirkungen aller Na-Salze im grossen und ganzen als gleichartig betrachten kann. (s. unten S. 39)

IV. DIE ABHÄNGIGKEIT DES E.M. VERHALTENS DER FROSCHHAUT VON DEN SALZARTEN.

A. *Methodik.*

Die Versuchsanordnungen sind dieselben wie bei den vorangehenden Versuchen. Hier werden aber nur Salzlösungen von gleicher Konzentration, und zwar 0.01m gebraucht, da die maximale Wirksamkeit der Salzlösungen ungefähr in diesem Bereiche zu liegen scheint. Die Experimente wurden an demselben Präparate mit verschiedenen Salzlösungen ausgeführt, um die individuellen Einflüsse auf die Unterschiede in der Wirkung der Salzlösungen soweit wie möglich auszuschalten.

B. *V Versuchsergebnisse.* (hierzu Tafeln VII, VIII)

a) Beim Wechseln der äusseren ableitenden Flüssigkeit wird das vorher herrschende Gleichgewicht zerstört, und die neue Gleichgewichtslage wird nach mehr oder weniger langem Zeitverlauf wieder erreicht. Die zeitlichen Verläufe sind im grossen und ganzen ähnlich denjenigen in den vorigen Versuchen.

Jedoch treffen wir hier in den meisten Fällen nur den I. Typus des Verlaufes an. Der II. Typus des Verlaufes kommt sehr selten vor. Dies kann sehr wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass hier Lösungen der gleichen und kleineren Konzentrationen zur Anwendung kamen.

b) Bevor man die quantitativen Beziehungen überblicken will, muss man zuerst ins Auge fassen, dass auch bei demselben Präparate und bei Anwendung einer Lösung desselben Salzes von

*Von CsCl konnte die Lage in dieser Kationsreihe nicht bestimmt werden, da nur ein Versuch mit CsCl ausgeführt worden ist.

derselben Konzentration nicht immer derselbe Gleichgewichtswert erreicht werden kann. Diese Abweichungen der Gleichgewichtswerte von einander sind nicht gross, aber doch sicher bemerkbar.

Dieses Verhalten muss in innigem Zusammenhange mit den Umständen stehen, unter denen auch das vorige Gleichgewicht erreicht worden ist, d.h. es steht in Beziehung mit der Vorgeschichte der Versuche oder dem jeweiligen Zustande der Haut. Hier ist natürlich von etwas Gesetzmässigem keine Rede, aber bei einigen Versuchen bemerkt man, dass die E.M.K. beim wiederholten Wechseln von einer Lösung zur anderen jedesmal, wenn auch wenig, gesteigert wird. Jedenfalls können wir diese Schwankungen verstehen, wenn wir daran denken, dass die Bestandteile der Froschhautgewebe hauptsächlich kolloide Substanz sind, und dass die Kolloide im allgemeinen unter verschiedenen Einwirkungen Hysteresiserscheinungen äussern.

Aus solchen schwankenden Gleichgewichtswerten sind die einfachen arithmetischen Durchschnittswerte ausgerechnet worden und in der ersten Kolonne der folgenden Tabelle angegeben. Die zweite Kolonne stellt die Diffusionspotentiale zwischen Ringer'scher Lösung und den verschiedenen Salzlösungen von 0.01m dar. In der dritten Kolonne sind die korrigierten Werte zusammengestellt.

1) Versuch No. 268

KCl	-7.53	+12.08	- 4.55
KBr	-7.13	+11.92*	- 3.79
KJ	-7.72	+11.92*	- 4.20
KNO ₃	-8.05	+12.42*	- 4.37
KSCN	-8.69	+12.85*	- 4.16
K ₂ SO ₄	-7.07	+ 9.15*	- 2.08

2) Versuch No. 269

KCl	-13.25	+12.08	- 1.17
RbCl	- 8.26	+12.20	- 3.97
CsCl	- 7.67	+12.20**	- 4.53
NH ₄ Cl	- 6.82	+12.01	- 5.19
LiCl	+14.55	+10.56	+24.91
NaCl	+20.96	+11.14	+32.10

3) Versuch No. 265

NaCl	+54.31	+11.14	+65.41
NaBr	+50.22	+10.94	+61.16
NaJ	+54.48	+10.94	+65.42
NaNO ₃	+57.43	+11.41	+68.84

4) Versuch No. 266

NaCl	+ 9.0	+11.14	+20.14
NaBr	+ 5.4	+10.94	+16.34
NaJ	+10.45	+10.94	+21.39

NaNO ₃	+ 9.28	+11.41	+20.69
Na ₂ SO ₄	+11.05	+ 8.04	+19.45

N.B. Die Diffusionspotentiale sind aus den berechneten Werten in der Tabelle auf s. 19 interpoliert. Die mit * versehenen Werte wurden unter der Annahme von

$$\frac{\pi_{\text{KCl}}}{\pi_{\text{NaCl}}} = \frac{\pi_{\text{KBr}}}{\pi_{\text{NaBr}}} = \text{u. s. w.}$$

und derjenige mit ** unter Annahme von

$$\text{CsCl} = \text{RbCl.}$$

berechnet.

Daraus ergibt sich, dass K-, Rb-, Cs-, und NH₄-Salze kleinere Wirkungen als Li-, und Na-Salze zeigen, und dass die Salze derselben Kationen keine grossen Unterschiede in ihren Wirkungen zeigen. Also was wir im vorigem Kapitel (s. 34) vermutet haben, ist hier zahlenmässig festgestellt. Diese Unabhängigkeit sollte ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der bioelektrischen Ströme sein, obwohl wir noch keine anschauliche Begründung dafür haben.

Diese Unabhängigkeit ist aber keine absolute, so dass man doch zwischen verschiedenen Anionen kleine evidente Unterschiede bemerken kann; und zwar ergibt sich aus obiger Tabelle:

Aus 1) (SO₄) < J < SCN < Br < NO₃ < Cl

Aus 2) Br < Cl < S < NO₃

Aus 4) Br < SO₄ < Cl < NO₃ < J

Das Nichtübereinstimmen der Anionreihen mit einander können wir vorläufig nicht ganz verstehen. Es ist wünschenswert weiter zu untersuchen, ob dies ausschliesslich von den individuellen Unterschieden bedingt ist, oder ob die Reihenfolge von der Konzentration abhängig ist, oder ob die Wirkung der Kationen resp. Anionen eine direktere Rolle spielt. Dass wir im vorigen Kapitel keine bestimmte Ordnung der Wirkungsgrösse bei verschiedenen Na-Salzen nachweisen konnten, ist vielleicht dem Umstande zuzuschreiben, dass dabei die individuellen Verschiedenheiten und gleichzeitig auch die der Anionwirkungen durch das Durchschnittsverfahren ausgeglichen worden sind.

Was die Kationreihe anbetrifft, so ergibt sich aus 2):

$$\text{K} < \text{Rb} < \text{Cs} < \text{NH}_4 < \text{Li} < \text{Na}$$

Diese stimmt mit der vorher erhaltenen (s. S. 34) ziemlich gut überein. Die kleinen Abweichungen zwischen beiden könnten wohl auf individuelle Einflüsse zurückgeführt werden.

c) Um die Unabhängigkeit des e.m. Verhaltens von den Anionen noch weiter zu veranschaulichen, wurde eine Reihe von Versuchen ausgeführt. Die gleichkonzentrierten Lösungen (nämlich 0.01m) der verschiedenen Na-, K-, Rb-, und

NH_4 -Salze wurden abwechselnd angewendet, so dass die Salzlösungen mit gleichnamigen Kationen resp. Anionen möglicherweise unmittelbar aufeinander folgten. Die Versuchsergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt :

1) Versuch No. 256

KCl	- 5.53	+12.08	- 6.55
NaCl	+34.03	+11.14	+45.17
			+38.62 = Na-K
KNO_3	- 8.05	+12.72	- 4.37
NaNO_3	+31.68	+11.14	+43.08
			+38.71 = Na-K

2) Versuch No. 262

KCl	-11.6	+12.08	- 0.45
NaCl	+26.35	+11.14	+37.49
			+37.04 = Na-K
KJ	-11.7	+11.92	- 0.22
NaJ	+24.18	+10.92	+35.12
			+34.90 = Na-K

3) Versuch No. 263

KBr	-11.25	+11.92	- 0.67
NaBr	+10.25	+10.94	+21.14
			+20.47 = Na-K
KCl	-12.35	+12.08	- 0.27
NaCl	+10.63	+11.14	-21.77
			+22.40 = Na-K

4) Versuch No. 264

NH_4NO_3	- 8.95	+12.3 *	- 3.55
NaNO_3	+21.8	+11.41	+33.24
			+29.89 = Na-NH ₄
$\frac{1}{2}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-11.65	+10.85*	- 0.8
$\frac{1}{2}\text{Na}_2\text{SO}_4$	+19.53	+10.95	+29.58
			+30.38 = Na-NH ₄
RbCl	-10.6	+12.20	- 1.6
NaCl	+26.5	+11.14	+37.64
			+36.14 = Na-Rb
$\frac{1}{2}\text{Rb}_2\text{SO}_4$	-16.63	+11.0 *	- 5.63
$\frac{1}{2}\text{Na}_2\text{SO}_4$	+19.53	+10.95	+29.58
			+35.21 = Na-Rb

5) Versuch No. 267

NH_4NO_3	-10.7	+12.3 *	- 1.6
NaNO_3	- 9.28	+11.14	+20.69
			+19.09 = Na-NH ₄

$\frac{1}{2}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	- 4.95	+ 9.06*	- 4.11
$\frac{1}{2}\text{Na}_2\text{SO}_4$	+ 11.05	+ 8.04	- 19.45
			+ 15.34 = Na - NH ₄
$\frac{1}{2}\text{Rb}_2\text{SO}_4$	- 9.94	+ 9.2 *	- 0.74
$\frac{1}{2}\text{Na}_2\text{SO}_4$	+ 11.05	+ 8.04	+ 19.45
			+ 20.19 = Na - Rb
RbCl	- 13.8	+ 42.20	- 1.6
NaCl	+ 9.0	+ 11.14	+ 20.19
			+ 21.74 = Na - Rb

N.B. Für die erste und zweite Kolonne vergl. die Anmerkungen auf s. 39.

Die Zahlen, die in der dritten Kolonne unter den Zahlenpaaren stehen, stellen die Differenzen der beiden Zahlen dar.

Daraus sieht man, dass die Differenzen der E.M.K.K., die den Salzlösungen verschiedener Kationen mit demselben Anion entsprechen, in jedem Versuche beinahe gleich sind.

Die erhaltenen Zahlenwerte sind natürlich nicht ganz gleich, aber sie können als sehr gut übereinstimmend angesehen werden, wenn man die verschiedenen Einflüsse berücksichtigt, und zwar diejenigen der Vorgeschichte oder die Wirkung der Anionen, die zwar nur sehr klein ist, aber doch immerhin sicher eine Rolle mitspielt. Die grösseren Abweichungen bei Sulfaten ändern nichts an unserer Behauptung, weil es sich dabei um ternäre Salze handelt, bei welchen nicht nur die Unterschiede des osmotischen Druckes oder des Dissoziationsgrades Einfluss auf die Grösse der E.M.K. ausüben können, sondern bei welchen auch die berechneten Diffusionspotentialwerte von den wirklichen ziemlich beträchtlich abweichen, im Vergleich zu binären Salze. (Vergl. Tower Tabelle 7).

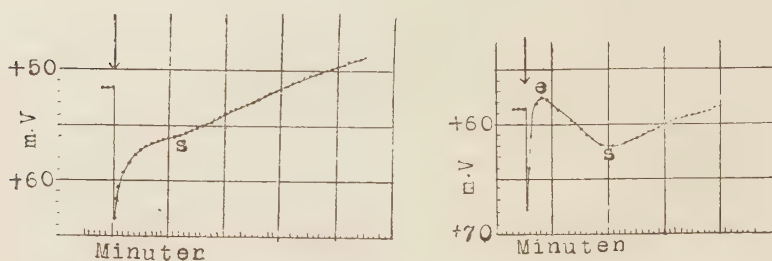
V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

Die Befunde von Dubois-Reymond (s. 11) und von Lesser (s. 128 ff.) können wir sehr leicht an Hand unserer Ergebnisse verstehen. Den Ansichten beider Forscher kann ich aber nicht ohne weiteres zustimmen, wenn sie die zeitliche Veränderung der E.M.K. einfach der vernichtenden Wirkung der ableitenden Flüssigkeit oder dem Absterben der Froschhaut zuschreiben wollen, da ich die Veränderung der E.M.K. vom II. Typus für eine physiologische und natürliche halte, denn man kann sonst nicht begreifen, warum diese Veränderung in ihrem Verlaufe den zweiten Extrempunkt zeigt. (Punkt e in Fig. 5).

Die konzentrierteren Salzlösungen wirken "schädigend" oder "vernichtend"

in dem Sinne, dass die E.M.K. welche der betreffenden Konzentration entspricht, kleiner ist als diejenige, die der verdünnteren entspricht. Aber es ist fraglich, ob man die Verkleinerung der E.M.K. ohne weiteres als eine Schädigung betrachten darf. Wenn eine schädigende Wirkung im wirklichen Sinne des Wortes auftreten würde so sollte sie später zu Tage kommen, indem sie immer mehr verkleinert auf die E.M.K. wirkt. Eine solche Schädigung kann wohl auftreten, da die Froschhaut in physiologischem Zustand nie mit konzentrierten Salzlösungen in Kontakt kommt. Bei unseren Versuchen begegnet man manchmal einer solchen Veränderung der E.M.K., die man sehr wahrscheinlich als eine Schädigungsfolge betrachten kann. In folgenden Figuren sind Beispiele solcher Fälle wiedergegeben.

Fig. 5



Von $0.12m \times \frac{1}{4}$ in $0.12m$ NaBr.

Von $0.12m \times \frac{1}{4}$ in $0.12m$ NaCl

Die Abnahme der E.M.K. am Schluss des Verlaufes ist sehr wahrscheinlich durch die Schädigung bedingt. Man muss beachten, dass diese Einwirkung erst zu Tage tritt, nachdem die eigentliche Veränderung schon beinahe zu Ende gekommen ist (Punkt *s* in Fig. 6). Da es aber unbegreifbar ist, dass die Schädigung erst vom Zeitpunkt *s* an anfangen sollte, darf man dieses Anfangsstück der Kurve nicht einfach als reinen Repräsentanten des Verlaufes der eigentlichen Veränderung der E.M.K. betrachten. Man kann doch annehmen, dass diese Beeinflussung wenigstens im Anfang nicht so bedeutend ist, indem man die allmähliche Zunahme der Schädigungsfolgen in Betracht zieht.

Dass Engelmann (s. 112) beim Beträufeln der einen Ableitungsstelle mit Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration oder Wasser eine anfänglich rasche Herabsetzung und ein darauf folgendes Ansteigen mit einem nochmaligen Herabsinken der E.M.K. bemerkte, stimmt mit unseren Versuchsergebnissen vollständig überein.

Beim Antröpfeln verändert sich die Konzentration der ableitenden Flüssigkeit, um die entsprechende Verfeinerung der E.M.K. hervorzurufen. Da der Diffusions-

vorgang im allgemeinen sehr langsam erfolgt, so dass die dort herrschende Konzentration eine Zeitlang beinahe konstant bleiben kann, behält infolgedessen die entsprechende E.M.K. auch eine Zeit lang einen beinahe konstanten Wert. Dass eine gleichartige Veränderung beim folgenden Antröpfeln nochmals auftritt, lässt sich ohne weiteres begreifen, da die Konzentration der ableitenden Flüssigkeit dadurch wieder eine Veränderung erleiden muss. Die Tatsache, dass die E.M.K. bei wiederholtem Antröpfeln immer mehr, bis zu einem gewissen Grade zunahm, ist dadurch erklärlich, dass die eingetröpfelte Flüssigkeit schnell von der Ableitungsstelle abfließt und die Veränderung der Konzentration der ableitenden Flüssigkeit sehr wahrscheinlich den Bereich der stärksten Wirksamkeit nicht überschritt. Dass das Wasser bei solcher Versuchsanordnung am stärksten negativierend wirkte, kann man von demselben Standpunkte aus verstehen.

Die ausgezeichnete Reversibilität bei Engelmann's Untersuchungen kann wohl darauf zurückgeführt werden, dass der physiologische Zustand der Froschhaut gut erhalten war, weil sie vorsichtig aufbewahrt war und ausserdem die Ableitung nur von einer kleinen Partie der Haut gestattet worden war. Ich habe auch einige Versuche über die Reversibilität ausgeführt. Bei solchen Versuchen war die Grösse der E.M.K.K., die derselben Konzentration entsprechen, je nachdem verschieden, ob das Wechseln der Ableitungsflüssigkeit in aufsteigender oder absteigender Konzentrationsreihe stattfand, und zwar waren die E.M.K.K. bei absteigender Reihe grösser als die entsprechenden bei aufsteigender Reihe, so dass die π -C-Kurve der absteigenden Reihe tiefer steht. (Vgl S. 38).

Nun wollen wir auf die Diskussion der Theorie der Elektrizitätsproduktion in Organismen eingehen, bevor wir versuchen, wie man unsere Versuchsergebnisse mit den bekannten Erscheinungen in Zusammenhang bringen kann.

Unter den Theorien, die bis heute aufgestellt worden sind, soll die Alterationstheorie zuerst genannt werden.

Die Theorie ist insofern sehr leistungsfähig, als sie verschiedenartige Erscheinungen von einem Gesichtspunkte aus begreiflich erscheinen lässt, was darauf zurückzuführen ist, dass sie vom reinen physiologischen Standpunkte ausgeht. Der prinzipielle Zug der Theorie, nämlich dass allen bioelektrischen Phänomenen irgendeine Veränderung an dem betreffenden Organ zugrunde liegen muss, kann wohl immer als ein wichtiger Gedanke in der Physiologie gelten, wenn es auch noch fraglich ist, ob die "Alteration" der eine und alleinige Grund der bioelektrischen Erscheinungen ist. Wie dem aber auch sein mag, so hat die Theorie doch keine Möglichkeit zu erklären, wie die Alteration die Elektrizitätsproduktion hervorruft oder begleitet,—mit anderen Worten, ob die Alteration selbst der elektrizitätsproduzierende Vorgang ist, oder ob die Elektrizitätsproduktion nur eine mit der Alteration gleichzeitig auftretende Erscheinung ist, oder ob die beiden Vorgänge in einem kausalen Zusammenhange stehen; d.h. man kann durch diese Theorie nicht erkennen, ob eine direkte Verkettung zwischen beiden Vorgängen

vorhanden ist. Zudem bleibt uns noch ganz unklar, was man unter der "Alteration" verstehen soll. Die Theorie kann uns erst befriedigen, wenn sie die obigen Fragen beantworten kann, indem sie im chemischen oder physikochemischen Sinne nachweist, was sie unter der Alteration verstanden wissen will.

Dann kommt die Membrantheorie im Betracht.

Der Begriff der Membran in den Organismen kann sehr umfangreich sein, wenn man sie vom funktionellen Gesichtspunkte aus definieren will. (Vgl. Zangger, Loewe). Wir können nach den verschiedenen Tatsachen annehmen, dass alle physiologischen Erscheinungen ohne Membranen im weiteren Sinne des Wortes überhaupt nicht zustande kommen können, sei die Membran nun ein anatomisch definierbares Gebilde, oder sei sie nur eine funktionell auffassbare Beschaffenheitsverschiedenheit an der Grenze der lebendigen Elemente.

Der Begriff der Membran in der Membrantheorie der Elektrizitätsproduktion in Organismen ist aber ein ganz beschränkter, und zwar nicht unbedingt notwendiger, wie der Begriff der Membran im weiteren Sinne.

Bernstein (S. 527) und Hüber (S. 570) stellen sich vor, dass die bioelektrischen Erscheinungen auf eine Art Konzentrationskette zurückzuführen sind indem sie—sich der Hypothese von Wil. Ostwald anschliessend—eine selektive Permeabilität der Membran d.h. einen grossen Unterschied der Ionenwanderungsgeschwindigkeit in der Membran selbst, sogar eine Undurchlässigkeit einer Art Ionen durch die Membran annehmen.

Die Membran wird nach ihrer Annahme von beiden Seiten her von den Lösungen eines Salzes aus verschiedenen Lösungsmitteln berührt. Da die sog. Verteilungspotentiale in dem Sinne von Luther und van Laar an den beiden Grenzen Null sein sollen, tritt hier nur ein Diffusionspotential in der Membran selbst wegen des ungleichen Verteilungsverhältnisses des Salzes an den beiden Grenzen auf. Angenommen, dass die Wanderungsgeschwindigkeit von Anion Null ist, d.h. $v=0$ gesetzt wird, so ist dieses Potential, welches durch die bekannte Nernst'sche Formel ausgedrückt wird, einer Konzentrationskettenformel gleich, d.h.

$$\pi = k \cdot \log \frac{C_1}{C_2}$$

Die eigentlichen Sachverhältnisse zeigen aber noch kompliziertere Beziehungen, und infolgedessen soll man strenggenommen hier nicht obige Nernst'sche Formel, sondern die Plank'sche (s. S. 17) anwenden. Falls man die Nernst'sche Formel als annähernd anwendbar annimmt, so treten der Theorie doch mehrere Schwierigkeiten entgegen. 1). Die Hypothese von Ostwald ist schon lange

bezweifelt worden, (Walden, Nernst), und man kann die der Hypothese zugrunde liegenden Erscheinungen auf andere Weise auffassen, so dass diese sehr unwahrscheinliche Vorstellung nicht mehr nötig ist (Vgl. Beutner, Reichinstein). Also ist die Annahme von $v=0$ sehr unwahrscheinlich und nicht notwendig. 2) Die logarithmische Abhängigkeit der E.M.K. von der Konzentration, wie sie die Konzentrationskette verlangt, ist — ein wesentlicher Punkt der Theorie — noch nicht tatsächlich bewiesen worden. Wenn man die Abweichungen der Versuchsergebnisse von dem Gesetze doch durch verschiedene Annahmen (z.B. die Verletzung der selektiven Permeabilität durch die Einwirkung der Salzlösung u.s.w.) begreiflich machen will, begegnet man dabei noch einer merkwürdigen Tatsache, die Brünings (S. 409) gefunden hat, nämlich dass die E.M.K. des Verletzungsstromes fast unabhängig von der Konzentration der inter- und intrafibrillären Flüssigkeit ist. Um dies zu erklären, will man die Plank'schen Formel

$$\pi = \frac{RT}{F} \log \frac{u_1 + v_2}{u_2 + v_1}$$

zur Anwendung bringen (Höber, S. 587). Die Bedingungen, die die Formel voraussetzt, sind aber bei den Organismen nicht erfüllt. Wenn man trotzdem die Anwendung dieser Formel für alle bioelektrischen Erscheinungen zur Geltung bringen will, wird man zur Annahme einer noch beschränkteren selektiven Permeabilität, d.h. nur einer Permeabilität für ein Kation, das in den Gewebeelementen enthalten ist, genötigt. Diese Annahme ist doch sehr unwahrscheinlich, da wir nach Beutner und unseren Versuchen die vollständige Reversibilität der bioelektrischen Potentialdifferenzen gegenüber den verschiedenen Kationen kennen. 3) Bernstein meint eine sichere Stütze für seine Theorie erhalten zu haben, als er eine geradlinige Abhängigkeit der E.M.K. der Verletzungsströme des Muskels von der absoluten Temperatur gefunden hat. Aber eine solche Abhängigkeit kann auch bei anderen Kettenarten vorkommen, wenn die sonstigen Bedingungen, wie die Wanderungsgeschwindigkeit oder die Konzentration der ableitenden Flüssigkeit u.a., konstant bleiben, wie Bernstein es angenommen hat.

Jedenfalls können wir uns nicht einfach der Membrantheorie anschließen, zumal da wir dabei noch auf andere, von der Theorie nicht erklärte Tatsachen wie z.B. den kleinen, doch umgekehrten Verletzungsstrom beim Kaliummuskel u.a.—stossen, welche sich alle nach unserer eigenen Theorie (Vgl. nächstfolgende Abhandlung) leicht erklären lassen.

Die Theorie von Galotti stellt auch eine Abart der Membrantheorie dar. Wir haben keinen Grund, die irreziproke Permeabilität anzunehmen. (Vgl. die bald folgende Mitteilung über die Permeabilität der Froschhaut).

Die Theorie der Phasengrenzkräfte (Haber, Haber und Klemensiewicz) scheint uns aussichtsreicher zu sein, da man nach dieser Theorie die verschiedenen Voraussetzungen der Membrantheorie, die uns unannehmbar scheinen, nicht nötig hat. Sie setzt aber voraus, dass die Konzentration in der wasserunlöslichen Phase immer konstant bleiben muss, und verlangt auch die logarithmische Abhängigkeit der E.M.K. von der Konzentration in der wässrigen Phase. Es

fragt sich, ob diese Voraussetzung in den organisierten Geweben erfüllt werden kann, besonders wenn man die ableitende Flüssigkeit wie bei unseren Versuchen wechselt.* Auf alle Fälle können unsere Versuchsergebnisse nicht einfach nach dieser Theorie begriffen werden, da die verlangte logarithmische Abhängigkeit darin nicht zu finden ist. Dies war auch der Hauptgrund dafür, dass Beutner eine neue Theorie des Verteilungspotentials** hat. Bis Beutner hat die Theorie der Phasengrenzkkräfte nur die Möglichkeit angezeigt, dass die bioelektrischen Erscheinungen dadurch mit bekannten physikochemischen Erscheinungen in Zusammenhang gebracht werden können; aber es fehlte an exakten quantitativen Untersuchungen über die logarithmische Abhängigkeit der E.M.K. von der Konzentration. Nach den experimentellen Abweichungen von diesem Gesetze schloss er, dass man das Postulat der konstanten Ionenkonzentration in der wasserunlöslichen Phase fallen lassen muss. Er stellt sich vor, dass eine Phasengrenzkraft durch die ungleichen Verteilungsverhältnisse der Salze zwischen den beiden Phasen auftritt. Diese nicht proportionale Verteilung, die er durch Schüttelversuch elektrometrisch angeblich bestätigt gefunden hat, wird von ihm irgendwelchen chemischen Umsetzungen zwischen den Salzen in den beiden Phasen zugeschrieben.

Beutner'sche Versuche an den "Oel"-Ketten bieten uns ein sehr lehrreiches Material von Tatsachen, und sein Gedankengang scheint uns sehr aussichtsreich; obwohl unsere Versuchsergebnisse nicht ohne weiteres nach seiner Theorie begreifbar sind, weil nach ihm keine Extrempunkte in den π -log (C)-Kurven zu erwarten sind, müssen wir dem prinzipiellen Zug seines Gedankenganges doch immer Beachtung zollen, zumal weil seine "Verteilungsverhältnisse" und unsere "Adsorbierbarkeit" (Vgl. unten S. 54) in Wirklichkeit einander ganz nahe stehen.

Neuerdings will Rosnyi von dem Standpunkte aus dass die Gründe der Impermeabilität einer Membran für Salze darauf zurückzuführen seien, dass die Membran salzlos oder salzarm ist und die Salze in der Membran unlöslich sind, die bioelektrischen Erscheinungen als hauptsächlich von der Diffusion bedingt deuten. Die Voraussetzungen selbst sind einander widersprechend.

Wir haben damit gesehen, dass alle Theorien der Elektrizitätsproduktion in den Organismen, die bis jetzt vorgebracht worden sind, uns nicht befriedigen können, ausgenommen dass die Beutner'sche uns sehr aussichtsreich erscheint. So bleibt uns nur ein mögliches Erklärungsprinzip übrig: die Annahme eines Adsorptionspotentials, wenn man voraussetzt, dass die den bioelektrischen

* Cremer'sche Theorie nimmt eine Mittelstellung zwischen der Membrantheorie und der der Phasengrenzkkräfte ein.

** Man muss hier beachten, dass die Beutner'schen Verteilungspotentiale von den früheren Verteilungspotentialen im Sinne von Luther (Vgl. v. Laar) oder v. Laar (s. 117) ganz verschieden sind.

Erscheinungen zugrunde liegenden Vorgänge physikochemische seien, was sehr plausibel ist. Da wir aber noch zu wenig genaue Kenntnisse über den Mechanismus der Adsorption haben, ist es uns unmöglich, eine exakte physikochemische Theorie der Adsorption selbst auszubauen. So müssen wir vorläufig damit zufrieden sein, allgemein zu prüfen, ob die Annahme eines Adsorptionspotentials umfassender und hypothesenfreier die bioelektrischen Erscheinungen physikochemisch begreifbar machen kann.

Wenn man sich den Fall vorstellt, dass das Salz aus der Lösung adsorbiert wird, tritt gleich die Frage auf, ob dabei nur molekulare Adsorption stattfindet, mit andern Worten, ob in der Lösung die dissoziierten Salzionen paarweise mit den undissoziierten Molekeln zusammen adsorbiert werden, oder ob die Ionen eine selbstständige Adsorbierbarkeit besitzen. Aus bisherigen Erfahrungen scheint uns die Möglichkeit der letzteren Annahme hervorzugehen. Aber diese scheinbare Selbstständigkeit kann man von einem anderen Gesichtspunkte aus gut erklären, so dass man sich nur die molekulare Adsorption vorzustellen braucht.

Jedenfalls ist aber die Adsorptionsfähigkeit der Salze viel kleiner, als die der viel untersuchten organischen Verbindungen. Daher ist als erste Frage zu untersuchen, welche Gesetzmässigkeiten bei einer solchen kleinen Adsorption anorganischer Salze herrschen. Es wurde von Schmidt, Arrhenius, und Marc hervorgehoben, dass bei der Adsorption eine Sättigung vorkommt, und die bekannte exponentielle Adsorptionsisotherme soll nicht mit den Untersuchungsergebnissen übereinstimmen.

Marc hat dieses Verhältnis eingehend untersucht und gezeigt, dass bei der Adsorption derjenigen Substanzen, bei denen die Sättigung schnell eintritt, die Adsorptionsisotherme von früheren Autoren mit den Versuchsergebnissen nicht übereinstimmt, so dass nur die Anfangswerte eines Versuches durch die alte Exponentialformel oder die Formel von Schmidt u.a. ausgedrückt werden können, während die Endwerte desselben Versuches fast konstant bleiben. Die Adsorptionsisothermen beruhen alle auf besonderen Voraussetzungen. Dass nur die Anfangswerte der Versuchsergebnisse durch diese Isothermen ausgedrückt werden können, während die Endwerte vollständig von diesen Formeln abweichen, bedeutet einfach, dass diese Formeln mit den Experimenten übereinstimmen, solange wie die Experimentgebiete von dem Sättigungszustand weit entfernt sind, so dass die Voraussetzungen der Formeln in Wirklichkeit nicht richtig sind, falls man den ganzen Adsorptionsprozess im ganzen Verlauf als einen kontinuierlichen betrachten will, wie es doch geschehen muss. Ich habe die Zahlenwerte von Marc genau untersucht und eine ganz einfache Formel gefunden, die trotzdem die gewonnenen Zahlenwerte gut wiederzugeben vermag:

Die Formel ist:

$$m = A(1 - e^{-kc})$$

Hierin bedeutet m die adsorbierte Menge, A die Sättigungsmenge, C die Konzen-

tration der Lösung bei dem Adsorptionsgleichgewichte, k eine Konstante.*

Dass diese Formel in sehr befriedigender Weise die experimentellen Ergebnisse ausdrücken kann, wird in den folgenden Beispielen gezeigt :

I Poinceau R R an Bariumsulfat. (Marc, S. 625)

C	gefunden	m	
		berechnet nach	berechnet nach
		$m = kC^n$	$m = A(1 - e^{-kC})$
		$n = 0.486$ $\log k = 0.8555$	$A = 0.052$ $k = 0.1636$
0.019	0.051	—	0.0449
0.033	0.047	—	0.0497
0.041	0.049	—	0.0511
0.019	0.049	—	0.0495
0.032	0.058	—	0.0497
0.041	0.049	—	0.0499
0.018	0.052	—	0.0493
0.034	0.046	—	0.0498
0.014	0.046	—	0.0465
0.003	0.042	0.042	0.0377
0.0067	0.032	0.036	0.0342
0.0043	0.026	0.025	0.026
0.0033	0.021	0.020	0.0215
0.0025	0.0155	0.0156	0.0175
0.0024	0.013	0.015	0.017
0.0013	0.006	0.009	0.010
0.0008	0.009	0.007	0.0065

II Patentblau an Strontiumkarbonat (Marc, S. 653)

C	gefunden	m	
		berechnet nach	berechnet nach
		$m = kC^n$	$A(1 - e^{-kC})$
		$n = 0.491$ $\log k = 0.0128 - 1$	$k = 0.113$ $A = 0.052$
0.048	0.052	0.069	0.0518
0.038	0.052	0.061	0.0513

*Diese Formel gilt hier nur als eine empirische. Die Frage ob die Differentialgleichung

$$\frac{\partial m}{\partial c} = k(A - c)$$

$$m = A \quad \text{für} \quad c = \infty$$

deren Lösung eben die obige Formel ist, thermodynamisch begründbar ist, bleibt offen.

II Patentblau an Strontiumkarbonat—*Fortsetzung.*

C	gefunden	m	
		berechnet nach $m = kC^n$ $n = 0.491$ $\log k = 0.0128 - 1$	berechnet nach $A(1 - e^{-kC})$ $k = 0.113$ $A = 0.052$
0.029	0.051	0.054	0.050
0.017	0.043	0.041	0.0445
0.014	0.036	0.038	0.0414
0.010	0.030	0.032	0.0352
0.0072	0.029	0.027	0.0235
0.0053	0.025	0.023	0.0235
0.0042	0.021	0.021	0.0200
0.0031	0.017	0.018	0.0158

Da nun die Adsorbierbarkeit der Salze aus den Lösungen im allgemeinen klein ist, muss die Sättigung dabei relativ früh zustande kommen, so dass die Adsorption bei den Salzen durch obige neue Formel ausgedrückt werden muss.

Bei unseren Versuchen wollen wir also annehmen, dass die Salze aus den Lösungen an der Froschhautoberfläche nach der obigen Formel adsorbiert werden, und dass dabei A und k je nach den Salzarten verschieden sind, obwohl es sich immer noch fragt, ob die Adsorption an einer Fläche nach demselben Gesetze erfolgt. Da wir wohl annehmen können, dass die Konzentration der Adsorptionsschicht proportional der adsorbierten Menge sei, so muss die Konzentration der Salze an der Oberfläche der Haut

$$C_1 = A(1 - e^{-kC})$$

sein.

Die Adsorptionsschicht bildet sehr wahrscheinlich eine heterogene Phase den äusseren Lösungen gegenüber, und wenn die E.M.K. zwischen der Adsorptionsschicht und der Lösung als eine Phasengrenzkraft betrachtet werden könnte, so würde die Abhängigkeit der E.M.K. von der Konzentration durch die folgende Formel ausgedrückt werden:

$$\pi = \frac{RT}{F} \{ \log A / (1 - e^{-kC}) - \log C \}$$

Dann zeigt die π -log (C)-Kurve weder Grenzwert noch Extrempunkt. Also die Annahme, dass das Adsorptionspotential sich wie eine Grenzkraft verhalten würde, ist nicht richtig.

Neuerdings hat Reichstein uns auf die besonderen Eigenschaften der Adsorptionsschicht aufmerksam gemacht, indem er dadurch verschiedenartige

Erscheinungen, welche sich an der Grenze heterogener Phasen abspielen, einheitlich zu erklären versuchte. Sein Gedankengang scheint uns sehr plausibel zu sein, weil dadurch die mannigfaltigen Erscheinungen, die bisher noch unklar geblieben sind, von einem bestimmten Standpunkte aus leicht begreiflich gemacht werden.

Diese Theorie ruft bei uns grosses Interesse hervor, einmal weil sie sich sehr gut zutreffend auf die bioelektrischen Erscheinungen anwenden lässt, und zweitens deswegen, weil die Adsorptionsschicht als nichts anderes zu betrachten ist, als die Membran selbst im weiteren funktionellen Sinne.

Bei unseren Versuchen fehlt es noch an Material, um diese Theorie quantitativ anzuwenden. Aber wenn man sich vorläufig mit den qualitativen Beziehungen begnügen will, kann man unsere Versuchsergebnisse sehr gut verstehen.

Wir wollen nun analog mit Reichinstein annehmen, dass an der Froschhautoberfläche die Salze aus den Lösungen adsorbiert werden. Diese Salze befinden sich in der Adsorptionsschicht in Form der Lösung, und eine organische unbekannte Substanz löst sich auch in dieser Schicht aus der Hautoberfläche heraustretend auf. Die Salzkationen bilden mit der organischen Substanz eine Art von Komplexionen, die mit den übrigbleibenden Anionen der Salze zusammen elektrische Neutralität in dieser Schicht erhalten. Die auf diese Weise verschwindenden Kationen werden durch Diffusion aus der Lösung ersetzt, während die Anionen in der Lösung zurückbleiben, da sie schon in der Adsorptionsschicht in genügender Menge vorhanden sind.

Diesen Gedankengang kann man annähernd folgenderweise analytisch formulieren. Wir wenden als äussere Ableitungsfähigkeit die Lösung irgendeines Salzes—MS—an, wo M das Kation, S das Anion bedeutet.

Dann soll die Konzentration C des adsorbierten Salzes in der Adsorptionsschicht proportional der adsorbierten Salzmenge sein, d.h.

$$C = A(1 - e^{-kC})$$

wenn man mit C die Konzentration der äusseren Lösung bezeichnet. Infolgedessen ist die Konzentration der Ionen in der Adsorptionsschicht

$$C' = Af(c)(1 - e^{-kC})$$

wo $f(c)$ den Dissoziationsgrad des Salzes in dieser Schicht bedeutet. Nach unserer Annahme bildet das Kation M^+ mit der organischen Substanz X eine Komplexion, also



Nach dem Gesetz der chemischen Statik gilt dann

$$[M^+][X] = \alpha[MX^+]$$

Wenn die Konzentration von X beinahe konstant bleiben würde, was man wohl annehmen kann, wenn die Löslichkeit von X sehr klein ist, dann ist

$$[M^*] = \alpha' [MX^*]$$

oder

$$[MX^*] = \beta [M^*]$$

d.h. die verschwindende Menge von M^* ist der Konzentration derselben $[M^*]$ proportional, und zwar

$$= \beta \cdot A f(c) (1 - e^{-kc})$$

Diese Menge von M^* wird durch Diffusion aus der Lösung ersetzt, um die Bedingung

$$[M^*][S'] - \gamma [MS]$$

zu erfüllen. Da die genügende Menge S' sich schon in der Adsorptionsschicht befindet, bleiben dabei die Anionen in der Lösung.

So tritt eine Doppelschicht auf, deren Belegung, infolgedessen die Potentialdifferenz ungefähr als proportional der Menge der Ionen, die diese Doppelschicht ausbilden, angesehen werden kann, d.h.

$$\pi = k_2 A f(c) (1 - e^{-kc})$$

Aber das Sachverhältnis ist wohl in Wirklichkeit noch viel verwickelter, und wir können sehr wohl annehmen, dass sich viel kompliziertere chemische Reaktionen in der Adsorptionsschicht abspielen, die alle auf die Ausbildung der elektrischen Doppelschicht irgendwie Einflüsse ausüben. Welche Prozesse auch dabei die Hauptrolle spielen mögen, so können wir doch leicht erkennen, dass die bioelektrischen Erscheinungen—auch wenn unsere obige Annahme richtig wäre—unter keinen Umständen durch eine einfache Formel mit quantitativer Genauigkeit ausgedrückt werden können. Es müssen also die eigentlichen Potentialdifferenzen etwa durch die Formel ausgedrückt werden:

$$\pi = k_2 f_1(c) (1 - e^{-kc}) + f_2(C)$$

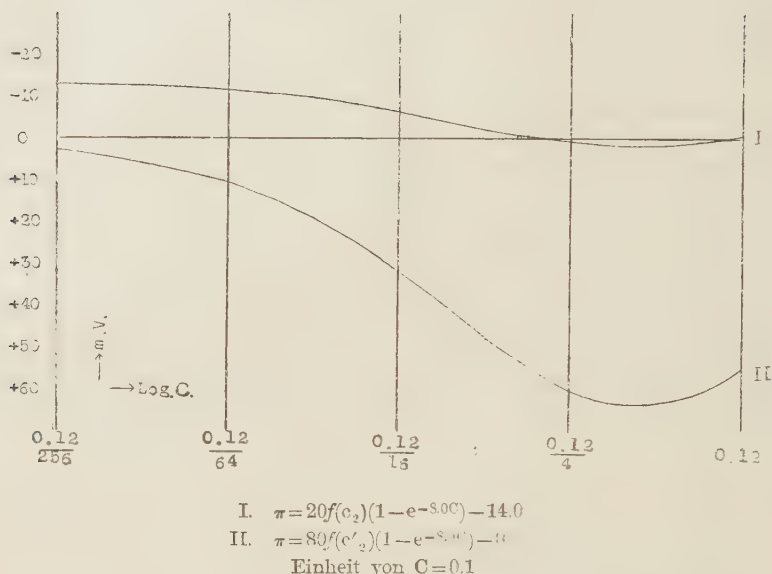
$f_2(C)$ ist eine unbekannte Funktion der Konzentration der äusseren Ableitungsflüssigkeiten, und soll als Faktoren einen physikochemischen Ausdruck der "Schädigung," der Veränderung der Permeabilität u.a. enthalten. Die Kurven in der folgenden Figur stellen diese Formel mit beliebig ausgewählten Werten der Konstanten dar.

Dabei ist nach Arrhenius

$$f(c) = \frac{\lambda c}{\lambda \infty}$$

gesetzt. Diese Auffassung ist vielleicht hier nicht genau zutreffend, da die Salzlösung in der Adsorptionsschicht stark konzentriert sein soll; aber sie mag doch vorläufig genügen, weil wir hier nur die qualitative Seite des Sachverhältnisses erkennen wollen.

Fig. 11.



Diese Kurven sind denjenigen vollständig ähnlich, die in den Tafeln IV-VI wiedergegeben sind, und unsere theoretischen Folgerungen können in qualitativer Hinsicht als zutreffend betrachtet werden.

Bei unseren Versuchen findet man in einigen Fällen, besonders bei den Salzen mit kleineren Wirkungen, dass die E.M.K., die den kleinen Konzentrationen entsprechen, grösser sind als diejenigen, die den nächstkonzentrierten Lösungen entsprechen. Diese Tatsache ist wohl dem Umstande zuzuschreiben, dass die Salze aus der Haut selber herausdiffundieren. (Vgl. S 28). Diese Menge Salze soll aber sehr klein sein und kann nur bei kleineren Konzentrationen der Ableitungsflüssigkeiten merkbare Einflüsse ausüben. Aber dass die Potentialdifferenzen bei verdünnten Lösungen beträchtlich von der logarithmischen Abhängigkeit von der Konzentration der Ableitungsflüssigkeiten abweichen, darf man nicht einfach auf die Verunreinigung der Ableitungsflüssigkeit zurückführen. (Vgl. Beutner, 1913 a S. 75)

So sind wir bei dem Punkte angelangt, wenigstens bei Froschhaut annehmen zu können, dass die Adsorption der Salze der dem

e.m. Verhalten derselben zugrunde liegende, wesentlichste Prozess ist.

Wir wollen nun weiter prüfen, ob man dadurch andere Tatsachen begreiflich machen kann. In erster Linie kommt der Verlauf der Veränderungen der E.M.K. beim Wechseln der äusseren ableitenden Flüssigkeiten in Betracht. Was ist die Konsequenz obiger Annahme? Die Veränderungen der E.M.K. beim Wechseln der ableitenden Flüssigkeiten müssen zeitlich analog der Adsorption verlaufen. Nach unserer Formulierung ist

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial x}{\partial c} &= k_1(A-x) \\ \text{Für } c &= \infty \quad x = A \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

wo x die adsorbierte Menge der Salze bedeutet. Es ist bekannt, dass der zeitliche Verlauf der Adsorption unter sonstigen konstanten Bedingungen durch die folgende Gleichung definiert wird

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial x}{\partial t} &= k_2(a-x) \\ \text{Für } t &= \infty \quad x = a. \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

Bei unseren Versuchsanordnungen ist die äussere Ableitungsflüssigkeit möglichst in Ruhe erhalten worden. So muss wegen der Adsorption die Konzentration der äusseren Ableitungsflüssigkeit ganz in der Nähe der Hautoberfläche zuerst vermindert werden, damit die dadurch entstehenden Konzentrationsgefälle durch die Diffusion von entfernter Stelle ausgeglichen werden. Es handelt sich also hier um einen Diffusionsvorgang zwischen zwei Grenzflächen mit der Bedingung, dass die Konzentration in einer Grenzfläche konstant bleibt, während die in der anderen Grenzfläche zeitlich veränderlich ist.

Analytisch ausgedrückt haben wir also die folgende Gleichung:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c}{\partial t} &= \alpha^2 \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \\ c &= c_0 \quad \text{für } t = 0 \\ c &= c_0 \quad \text{,, } x = 0 \\ c &= f(t) \quad \text{,, } x = s \end{aligned}$$

wo c die Konzentration, s die Lage der Hautoberfläche bedeutet. Da wir aber eben die Funktion $f(t)$, die selbst wieder von den Gleichungen (1) und (2) bedingt ist, zu finden haben, können wir die Differentialgleichung nicht auflösen. Wenn man aber unter vereinfachten Bedingungen das Problem zu lösen versucht, kann man annäherungsweise ableiten, dass die zeitliche Veränderung der Konzentration an der Hautoberfläche, und infolgedessen auch die Veränderung der E.M.K., als eine Summe der Exponentialfunktionen dargestellt werden kann; und man kann auch zeigen, dass die Versuchsergebnisse wirklich in die Exponentialfunktionen zerlegt werden können.*

* Die analytische Ableitung und die Analyse der experimentellen Kurven werden demnächst mitgeteilt.

Daraus können wir schliessen, dass der zeitliche Verlauf der Veränderung der E.M.K. beim Wechsel der Ableitungsflüssigkeit wesentlich von der Adsorption und der Diffusion bedingt ist.

Das Verhalten gegen LiCl-Lösung können wir uns vorläufig nicht genügend erklären. Dabei kann die physiologische Verwandtschaft von Li und Na eine wesentliche Rolle spielen, und infolgedessen die zeitliche Veränderung der Konzentration in der Hautoberfläche viel komplizierter sein.

Kurz gesagt, können wir unter der Annahme, dass die Adsorption das wichtigste Moment bei den e.m. Veränderungen darstellt, fast alle Besonderheiten in unseren Versuchsergebnissen gut begreifen.

Man wird sehen, dass unser Gedankengang dem von Beutner sehr nahesteht, wenn man berücksichtigt, dass das "Verteilungsverhältnis" von Beutner mit der "Adsorbierbarkeit" sehr verwandt ist. Aber die Annahme des Adsorptionsvorganges ermöglicht es uns, die Sachverhältnisse sehr leicht und exakt zu erkennen. (Vgl. die Schlussbetrachtung in der nächsten Mitteilung.)

Hiernach können wir die Verschiedenheit der Kationwirkungen folgenderweise begreiflich machen. In Versuchen über die Permeabilität habe ich konstatiert,* dass schwach wirksames Salz, z.B. KCl, leicht durch die Froschhaut durchdringt. Danach können wir uns wohl vorstellen, dass Kaliumsalze leicht in der Hautsubstanz und sehr wahrscheinlich wenig an der Hautoberfläche adsorbiert werden. Also rührt die Verschiedenheit der Kationwirkungen einfach von der Verschiedenheit der Adsorptionsfähigkeit der Salze her, die die betreffenden Kationen enthalten, weil die Verteilungspotentiale im Sinne von Laar und Luther von der Konzentration der Lösungen sehr wenig abhängig sind, so dass die Löslichkeit der Salze auf die Grösse der E.M.K. im Verhältnisse zur Adsorption nur wenig Einfluss ausüben kann. Nach unserer Theorie ist aber die e.m. Wirksamkeit nicht nur von der Adsorption allein bedingt, sondern auch von der Grösse der chemischen Umsetzung, d.h. die schwach wirksamen Kationen verbinden sich mit der organischen Substanz in der Haut nur schwach, während die stark wirksamen Salze grosse chemische Umsetzung hervorrufen.

* Darauf bezügliche Versuche werden bald ausführlich mitgeteilt.

Nach unserer Annahme ist die Unabhängigkeit des e.m. Verhaltens von den Anionen ohne weiteres klar, da der dabei zugrunde liegende Prozess das Verschwinden der adsorbierten Kationen ist. Es ist auch schon bekannt, dass bei vielen Kolloidalprozessen einmal nur Anionen und einmal nur Kationen die Hauptrolle ausüben. Ferner ist leicht zu verstehen, warum diese Unabhängigkeit keine absolute ist, da die Anionen auch in der Adsorptionsschicht, wenn auch sehr schwach, an den komplizierten chemischen Vorgängen teilnehmen können.

Die Abhängigkeit des e.m. Verhaltens der Froschhaut von der Temperatur ist schon längst bekannt. (Bach und Ohler, v. Gendre, Bayliss und Bradford.) Lesser (S. 137), der später die genaue bezügliche Untersuchung ausführte fand, dass die E.M.K. des Froschhautstromes nicht einfach proportional der absoluten Temperatur ist, sondern dass sie mit der Temperatursteigerung mehr zunimmt, als der Proportionalität entsprechen würde. Nach unserer Theorie ist der Hauptgrund für das e.m. Verhalten der Froschhaut die chemische Reaktion, die bekanntlich mit der Temperatursteigerung in der Regel stärker werden kann. Das Ansteigen der E.M.K. des Froschhautstromes kann also auch stattfinden, wenn die Adsorption wie in gewöhnlichen Fällen mit der Temperatursteigerung abnimmt, weil die Verminderung der Adsorption gewöhnlich verhältnismässig klein ist, so dass sie durch die Steigerung der chemischen Reaktion sehr gut überkompensiert werden kann. Gerade die Merkwürdigkeit, dass nach Lesser die Einflüsse der Temperatursteigerung ein Optimum zeigen, dürfte nach obiger Vorstellung leicht begreiflich sein.

Lesser (S. 142) hat die Froschhaut als zweifachen Sitz der E.M.K. betrachtet. Diese Annahme scheint uns ganz richtig zu sein. Nach unseren Betrachtungen muss die Hautinnenfläche auch dasselbe Verhalten wie die Hautoberfläche zeigen, da sie auch eine heterogene Trennungsfläche darstellt, obwohl graduelle Verschiedenheit dabei natürlich vorkommen kann, wie man schon an der schwachen Wirksamkeit der Hautinnenfläche bemerkt hat. Das Vorkommen dieser doppelten E.M.K. haben wir schon vorausgesetzt (Vgl. S. 33); dass die Hautoberfläche sich im Wasser oder in verdünnten Lösungen positiv der Hautinnenfläche gegenüber verhält, während die Negativität der letzteren mit der Konzentrationszunahme zum Vorschein kommt, kann man nur durch obige Annahme begreifen. Die schwache Wirksamkeit der Hautinnenfläche rührt wahrscheinlich davon her, dass diese von einer semi-

permeablen Membran bedeckt ist, so dass nur eine kleine Menge Salze mit der Zellsubstanz direkt in Berührung kommen kann.

Es ist natürlich eine Grundfrage, ob allen bioelektrischen Erscheinungen dieselben Prozesse zugrunde liegen. Dass die eigentliche Quelle der bioelektrischen Erscheinungen die Ionen sind, die in den sich berührenden Phasen enthalten sind, ist selbstverständlich; aber die elektrischen Doppelschichten, die diese Ionen ausbilden, können auf verschiedene Weise hervorgerufen werden. Infolgedessen darf man nicht einfach eine Theorie, die uns eine Gruppe der bioelektrischen Erscheinungen begreiflich machen kann, auf alle anderen übertragen, bevor man nicht die Gültigkeit der Theorie für die letzteren auch wirklich bewiesen hat. Von diesem Gesichtspunkte aus will ich nicht behaupten, dass unsere Theorie für alle bioelektrischen Erscheinungen gültig sei. Da aber der Weg der Wissenschaften ist, die verschiedenen sich nach innerer Verwandtschaft zusammengruppierenden Erscheinungen von einem einheitlichen Gesichtspunkte aus zu betrachten, so möchte ich in der folgenden Abhandlung versuchen, ob die Theorie als eine Arbeitshypothese zur Fragestellung für weitere Untersuchungen geeignet ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1) Aus den Versuchen an den ausgeschnittenen Froschhäuten, die an einer Glasröhre angebunden und innenseits mit Ringer'scher Lösung, aussenseits mit verschiedenen konzentrierten Lösungen von Alkalisalzen abgeleitet wurden, ergaben sich die folgenden Besonderheiten :

- a) Die zeitliche Veränderung der E.M.K. des Froschhautstromes beim Wechseln der äusseren Ableitungsflüssigkeit verläuft ziemlich kompliziert doch regelmässig. Es gibt zweierlei Verlaufstypen.
- b) Alkalichloride und verschiedene Na-Salze wirken alle negativierend, und zwar desto stärker bis zu einer gewissen Grenze, dann aber wieder schwächer, je konzentrierter die Lösungen sind. Destilliertes Wasser wirkt dagegen immer positivierend.

- c) So findet man dabei keine logarithmische Abhängigkeit der E. M.K. von der Konzentration der Ableitung-sflüssigkeit, sondern die π -log (C)-Kurve zeigt eine typische Form, und zwar hat sie einen Extrempunkt, ein Maximum im Sinne der Negativität der Hautoberfläche. In dieser Hinsicht soll die Diffusionspotentiale zwischen der einen Elektrode und den Ableitungsflüssigkeiten in Betracht genommen werden.
- d) Nach der Wirksamkeit kann man die Alkalisalze in zwei Gruppen einteilen. Die K-, Rb-, NH_4 -Salze, die schwächere Wirkung zeigen, bilden eine Gruppe, während die Na- und Li-Salze, die dagegen sehr stark wirksam sind, zu der anderen Gruppe gehören.
- e) Die negativierende Wirkung dieser Salze rührt hauptsächlich von den Kationen her, indem die Anionen dabei nur kleine Einflüsse ausüben.

2) Die Theorie der Elektrizitätsproduktion in den Organismen ist kritisiert und gezeigt, dass alle bisherigen Theorien obige Ergebnisse nicht begreiflich machen können.

3) Es wird eine neue Theorie des Adsorptionspotentials analog derjenigen Reichinstein's vorgelegt, und gezeigt, dass alle Besonderheiten der Versuchsergebnisse unter leicht annehmbaren Voraussetzungen begreiflich gemacht werden können.

LITERATUR

- Arrhenius S. (1912): Conference sur les these de la chimie physique. p. 20.
- Each, W. u. Oeler, R. (1880): Beiträge zur Lehre von den Hautströmen. Pflüger's Arch. **22**, 30.
- Bayliss W. M. (1908): Ueber die Permeabilität der Froschhaut mit besonderer Berücksichtigung der Wirkung von Kaliumionen und der Frage der irreziproken Durchlässigkeit. Bioch. Zeitscher. **11**, 226.
- Bayliss, W. M. and Bradford W. R. (1886): On the electrical phenomena accompanying secretion in the skin of the frog. Journ. of Physiol. **7**, 217.
- Erstein, J. (1912): Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Pflüger' Arch. **92**, 521.
- Leutner, R. (1913 a): Die physikalische Natur bioelektrischer Potentialdifferenzen. Bioch. Zeitschr. **47**, 73.

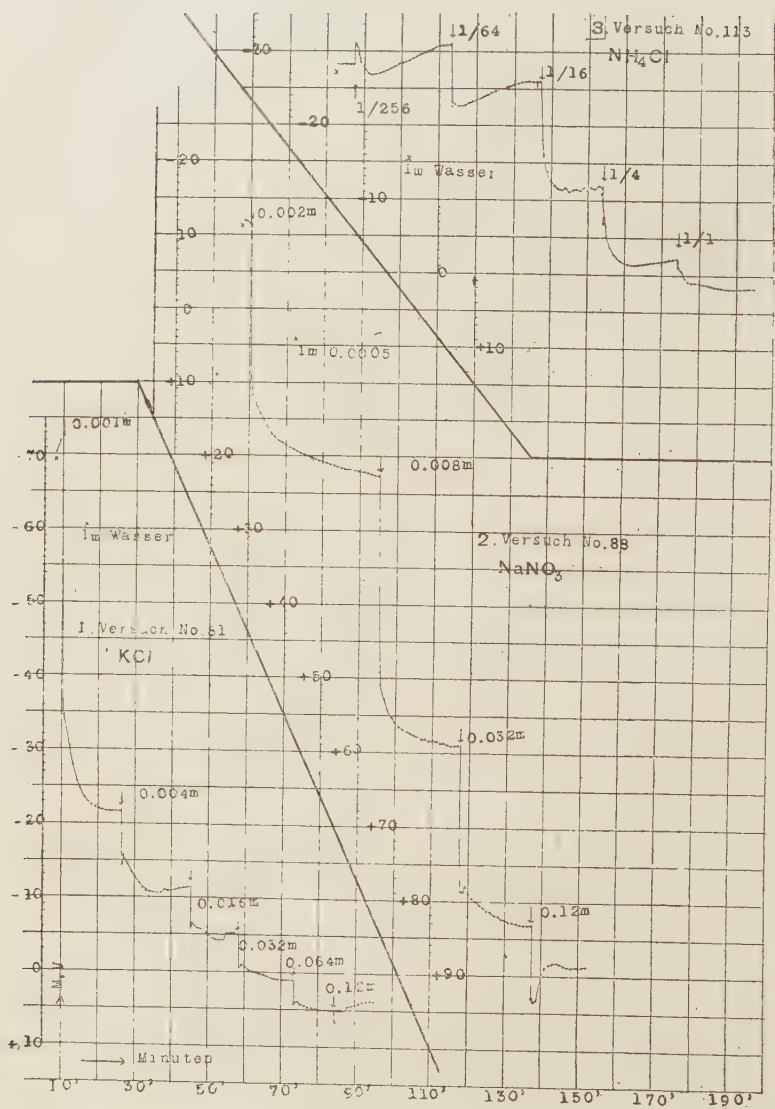
- Beutner, R. (1913 b): Neue Erscheinungen der Elektrizitätserregung, welche einige bioelektrische Phänomene erklären. *Zeitschr. f. Elektrochem.* **19**, 319. u. 467.
- .. (1914): Weitere Untersuchungen über das Verhalten wasserunmischbarer organischer Substanzen. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **87**, 385.
- Du Bois-Reymond, E. (1884): Untersuchungen über tierische Elektrizität. **II Abt. 2.**
- Brünnings, W. (1907): Zur osmotischen Theorie der Zellelektrizität. *Pflüger's Arch.* **117**, 409.
- Chanoz, M. (1905): Contribution à l'étude des phénomènes électriques présentés par la peau récente de grenouille au contact des dissolutions d'acides. *Journ. d. Physiol. et d. Pathol. général.* **7**, 804.
- Engelmann, Th. W. (1872): Die Hautdrüsen der Frosches. *Pflüger's Arch.* **6**, 97.
- Galeotti G. (1904): Ueber die elektromotorischen Kräfte, welche an der Oberfläche tierischer Membran bei der Berührung mit verschiedenen Elektrolyten zustandekommen. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **49**, 542.
- Gendré, A. v. (1884): Ueber den Einfluss der Temperatur auf einige tierische elektrische Erscheinungen. *Pflüger's Arch.* **34**, 412.
- Haber, F. (1908): Ueber feste Elektrolyte, ihre Zersetzung durch den Strom und ihr elektromotorisches Verhalten in galvanischen Ketten. *Annal. d. Physik* (4) **26**, 947.
- Haber, F. u. Klemensiewicz, Z. (1908): Ueber elektrische Phasengrenzkraft. *Zeitschr. f. physik.-Chem.* **67**, 385.
- Hüber, R. (1914): *Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe.* 4. Aufl.
- Lesser, E. T. (1907): Ueber die elektromotorische Kraft des Froschhautstromes und ihre Beziehungen zur Temperatur. *Pflüger's Arch.* **116**, 124.
- Loeb, J. u. Beutner, R. (1912): Ueber die Potentialdifferenzen an den unverschnitten und verletzten Oberflächen pflanzlicher und tierischer Organe. *Bioch. Zeitschr.* **41**, 1.
- Loewe, S. (1913): Membran und Narkose. *Biochem. Zeitschr.* **57**, 161.
- Marc, R. (1913): Ueber Adsorption und gesättigte Oberflächen. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **81**, 641.
- Orbeli, L. A. (1910): Die Abhängigkeit der elektromotorischen Wirkung der Froschhaut von den Eigenschaften der Ableitungsflüssigkeiten. *Zeitschr. f. Biol.* **54**, 329.
- Ostwald, Will. (1890): Elektrische Eigenschaften halbdurchlässiger Scheidewände. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **6**, 71.
- Plunk, M. (1890): Die Potentialdifferenz zwischen zwei elektrolytischen Lösungen. *Annal. d. Physik. N. F.* **40**, 651.
- Reichstein, D. (1914): Die Eigenschaften der Adsorptionsvolumen.
- Rohzyi: H. (1914 a): Impermeabilität und Membranpotential. *Biochem. Zeitschr.* **66**, 231.
- .. (1914 b): Zur Theorie der bioelektrischen Ströme. *Biochem. Zeitschr.* **66**, 248.

- Schmidt, G. S. (1911): Ueber Adsorption der Lösung II. Zeitschr. f. physik. Chem. **Bd. 77** s. 641.
- Schwarz, A. (1915): Ueber die Abhängigkeit der elektrischen Eigenschaften der Froschhaut von der Beschaffenheit der daran angrenzenden Medien und vom Nervensystem. Pflüger's Arch. **162**, 547.
- Tower, O. F. (1896): Ueber Potentialdifferenzen an den Berührungsflächen verdünnter Lösungen. Zeitschr. f. physik. Chem. **20**, 198.
- Zangger, H. (1908): Ueber Membranen und Membranfunktionen. Ergeb. d. Physiol. **8**, 99.
- Cremer, M. (1906): Ueber die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre der polyphasischen Elektrolytketten. Zeitschr. f. Biol. **47**, 562.
- Laar, J. J. (1907): Lehrbuch der theoretischen Elektrochemie. s. 122.
- Nernst, W. (1908): Zur Theorie des elektrischen Reizes. Pflüger's Arch. **122**, 275.

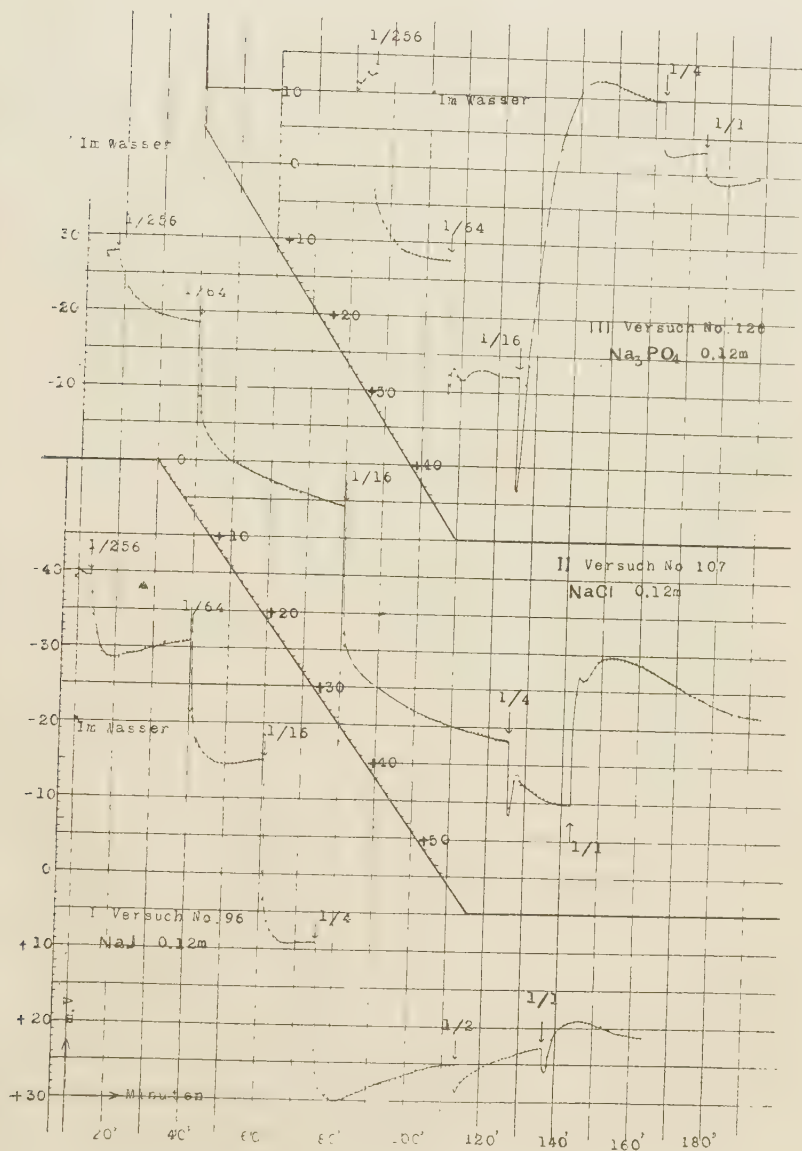
P. S.

In den folgenden Tafeln bedeuten die — Zeichen die Positivität der Hautoberfläche und die Pfeile zu Anfang der Kurve den Zeitpunkt, wo das Wechseln der Ableitungsflüssigkeit vollendet ist. Die Punkte stellen die gewonnenen Daten dar.

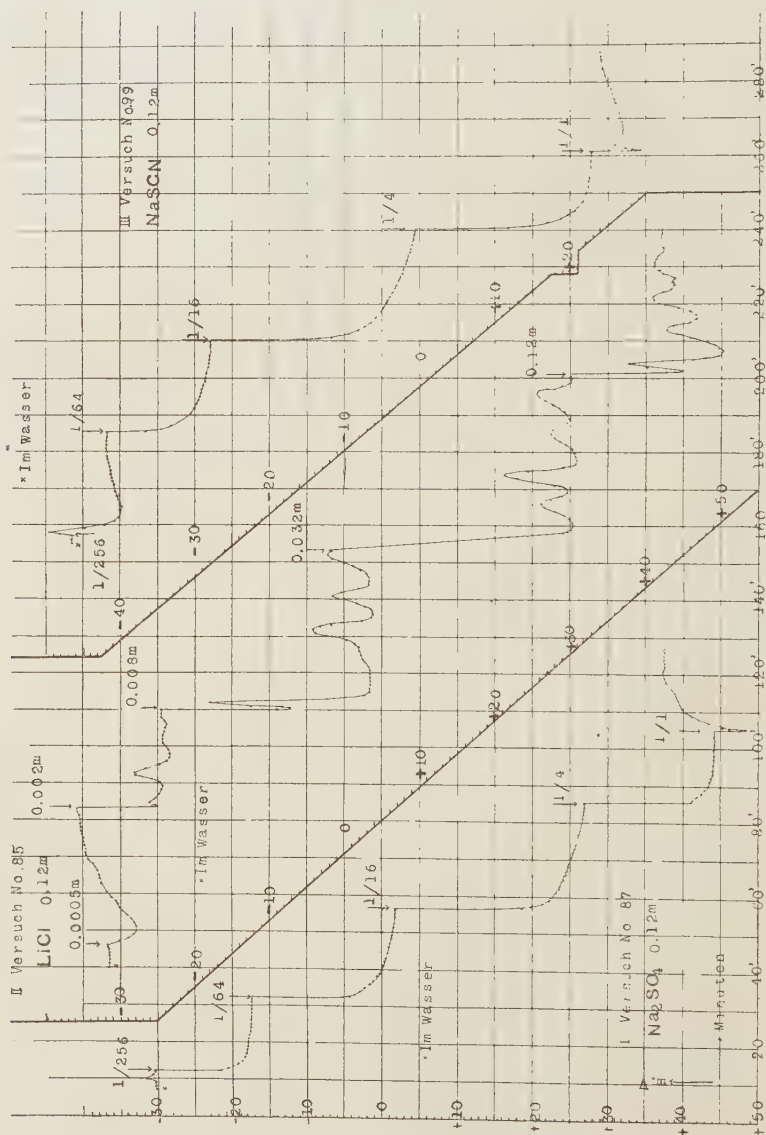
TAFEL I.



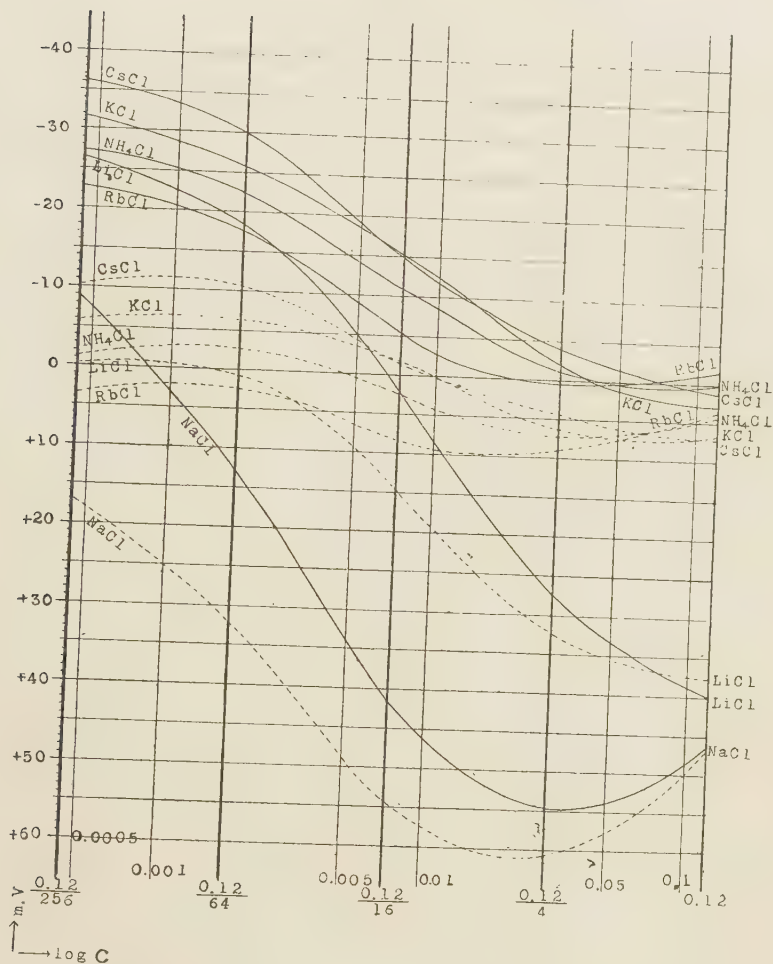
TAFEL II.



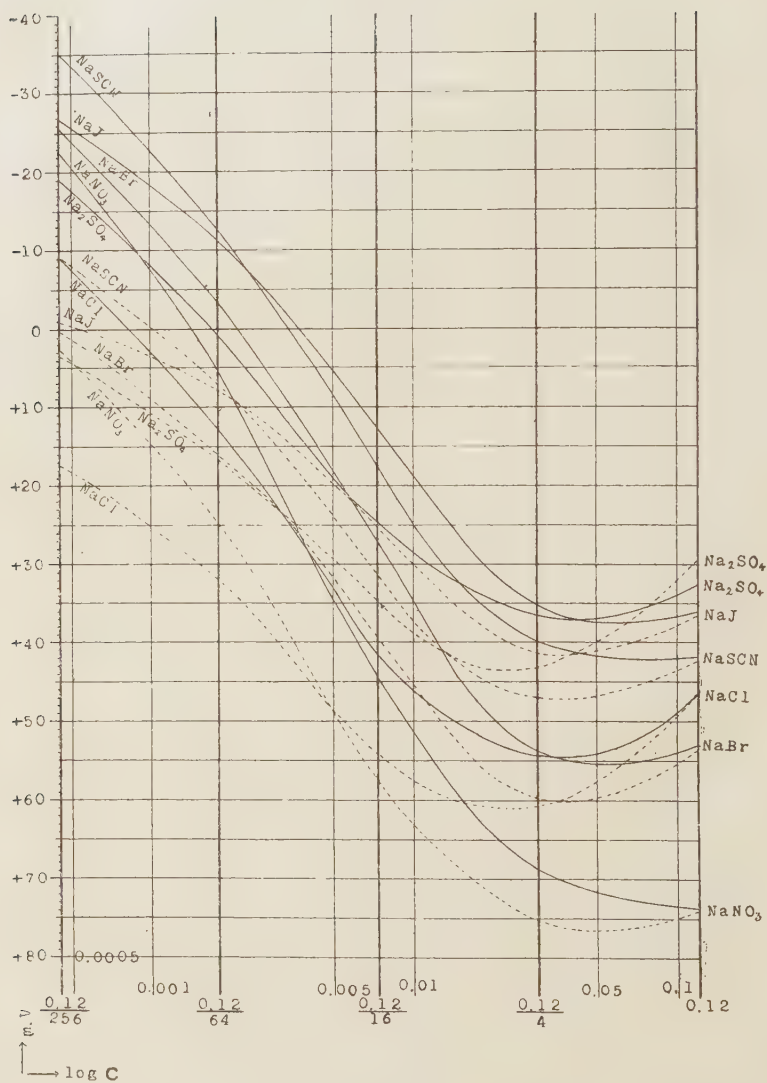
TAFEL III.



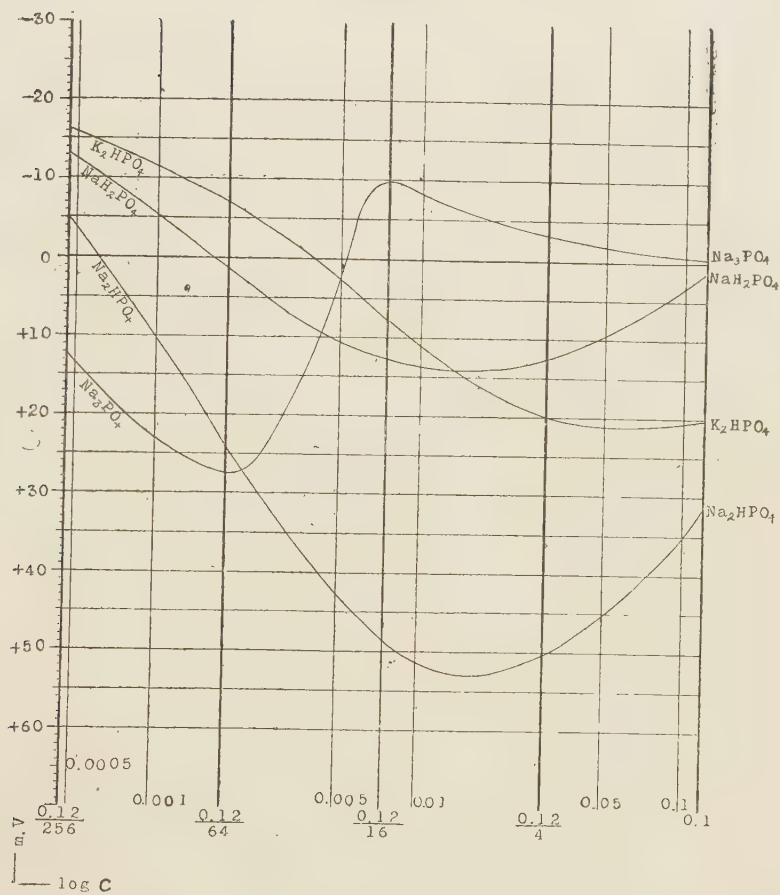
TAFEL IV.



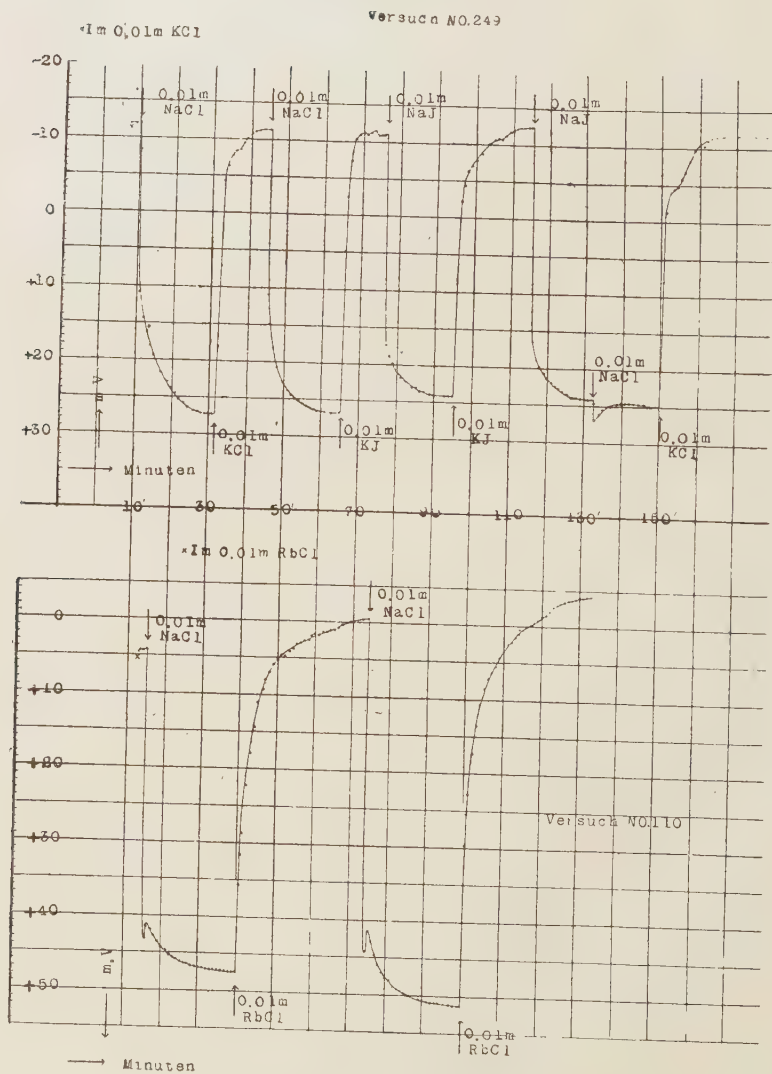
TAFEL V.



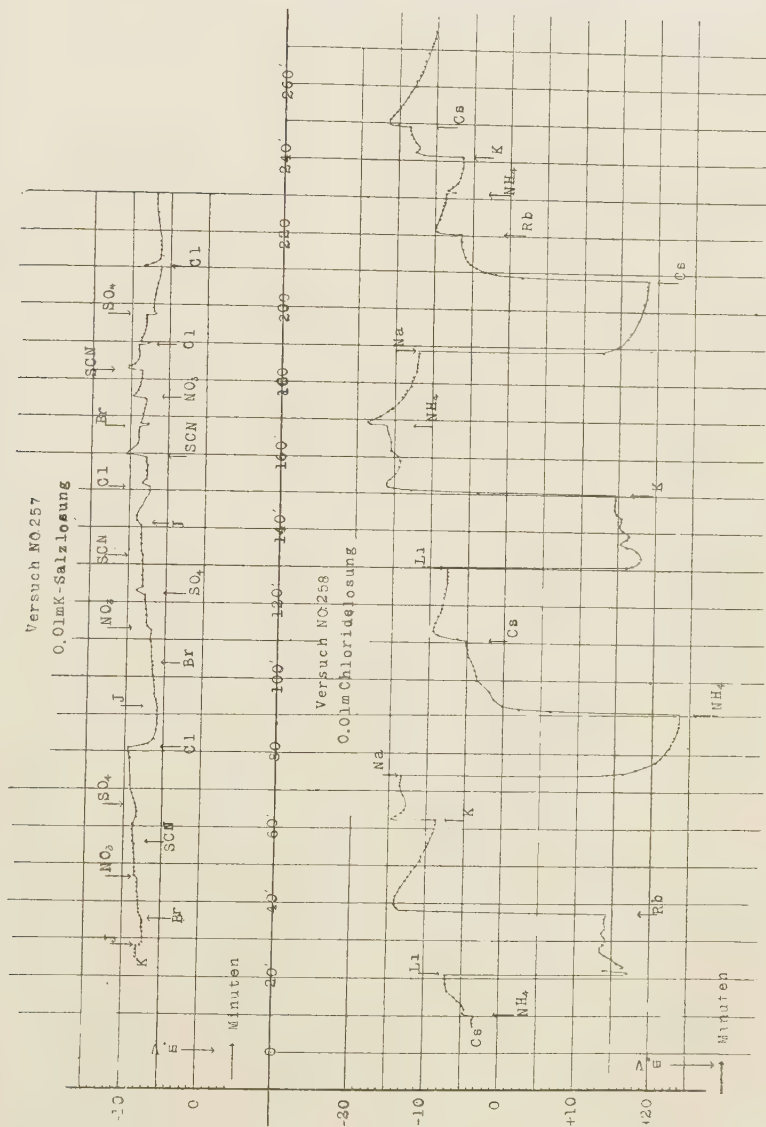
TAFEL VI.



TAFEL VII.



TAFEL VIII.





THE UREA CONTENT OF COW'S MILK. A SIMPLE METHOD OF DETERMINING UREA.

By

YOSHIO MORIMOTO.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tohoku Imperial University, Sendai. Director: Prof. Katsuji Inouye.)

(Received for publication, December 8, 1921)

A large number of methods based upon the decomposition of urea by the urease have been devised for the estimation of urea. Most of these methods necessitate the preliminary removal of the ammonia liberated by means of an air current. As pointed out by Kahn (1916-17), however, serious difficulties may be encountered by this latter procedure. Sumner (1916), too, stated that the accuracy of the urease methods is limited mainly by the error involved in aeration. On the other hand, the direct titration method of Marshall (1913) gives results lower than the theoretical, owing, perhaps, to incompleteness of the conversion of the urea into ammonium carbonate. And the direct Nesslerization method of Folin and Denis (1916) is apparently accurate, but somewhat tedious. Altogether, they are not sufficiently simple and accurate to find favour in routine work especially in the clinical laboratories. Accordingly, some authors still strive after a new procedure of urea-determination for practical use (Stehle 1921).

Several years ago an available modification of the urease method was described by Nagasawa. Investigating the distribution of urease in the seeds of cereals and leguminosae he found that this enzyme is present in abundance in the hypocotyl of the jack bean. Further, he could obtain an exceedingly powerful and stable urease solution by extracting it with glycerine. As a result of these findings he has worked out a practical method of determining urea, involving a slight modification of Marshall's method.

It may seem that very little improvement has been made by his procedure over the original; but, in reality, his method offers special advantages in that it saves time and allows of more accurate determinations. They are principally due to the excellent qualities of the urease solution the preparation of which he introduced.

But a direct titration method cannot be adopted for the analysis of coloured or turbid materials; for the conclusion is uncertain and it makes the determination less accurate. While engaged on work relating to the urease, an idea suggested itself to the author's mind that this defect might perhaps be eliminated by substituting casein for the indicator. As is well known, casein is precipitated from its solutions at a definite point of reaction. Moreover, it does not interfere with the action of urease upon urea. Special experiments have convinced him that this is actually the case, and that the procedure described below gives the most satisfactory results.

This procedure has been employed by the author in the examination of a considerable number of specimens of cow's milk and has proved satisfactory for the estimation of urea in the milk. As may be seen from the determinations recorded in the following paper, cow's milk contains 0.025 to 0.03 gm. of urea per 100 cc. For a few weeks immediately after calving, a remarkable increase may be attested, the maximum amount observed being 0.075 gm. But, it falls rather rapidly and reaches again its normal level within a month. Further, the milk of a goat was examined; it is considerably richer in urea than cow's milk, containing about 0.08 gm. of urea in 100 cc.

EXPERIMENTAL.

Method.

With the exception of an indicator, the procedure is exactly similar to that described by Nagasawa. As he has published his method only in Japanese, however, I think it advisable to describe it here in some detail.

Preparation of the urease solution. An excellent urease solution can be obtained in the following manner: one gram of the finely ground hypocotyl of jack bean is mixed with 100 cc. of a mixture of glycerine and water (8:2) and shaken for three hours at 35-40° by means of a shaking apparatus. According to the alkalinity of the mixture, 6-7 cc. of decinormal hydrochloric acid are now added and shaken an hour more; then the mixture is filtered through paper pulp.

This gives a clear solution which is very stable and maintains its activity without any appreciable loss for more than half a year at room temperature.

Execution of the method. According to the concentration, from 3 to 5 cc. of urine are put into a flask of 250-300 cc. capacity, diluted with 500 cc. of water, and 3 cc. of the urease solution and an indicator, 1 cc. of 3 per cent calcium caseinate in our case, are added. The flask is quickly plugged with a rubber stopper supporting a cylindrical tap-funnel, immersed in a water bath warmed at 38° and left there for three hours. The conversion of the urea into ammonium carbonate is then complete. At the end of this period, the flask is allowed to cool by placing it in cold water for a short time. A measured amount of decinormal hydrochloric acid, 40 cc. in general, is poured into the funnel. If the stopcock be now opened so as to allow the hydrochloric acid to drop into the flask, some air-bubbles will escape abruptly through the standard solution, especially when superpressure prevails in the flask on account of an insufficient cooling. It is best to open the stopcock gradually, so that the air may be liberated gently, and accordingly, any possible loss by the spattering of the measured standard solution may be prevented. Then, into the top of the funnel is inserted a one-holed stopper, through which passes a short glass tube which is connected with a small rubber bulb by means of a piece of rubber tubing. Applying a moderate pressure upon the rubber bulb, the hydrochloric acid in the funnel is introduced drop by drop into the flask, the last trace being quantitatively rinsed in with water. The contents of the flask are well mixed by gentle

shaking and the stopper is removed. Now, the excess of acid is titrated with 1/50 normal sodium hydroxide, until the casein begins to precipitate. The amount of sodium hydroxide required less the amount used in neutralizing the urine and that previously determined for 3 cc. of the urease solution, corresponds to the urea originally present in the sample of urine, and multiplied by 0.06 gives the value of urea expressed in grams per 100 cc. of urine.

The following tables demonstrate that this method gives results which are perfectly reliable. Exp. I and II were carried out according to the original direction, as given by Nagasawa.

TABLE I.

Experiment I. On pure urea solution. Urea per 100 cc.

No.	Amount of urea present in the urea solution. gm.	Amount of urea found. gm.
1	1.0	1.02
2	1.0	0.98
3	1.5	1.5

Experiment II. Recovery of urea added to urine.

No.	Urea present in 5 cc. urine. mg.	Urea added. mg.	Urea recovered. mg.	Remarks.
1	56.1	25.0	81.6	
2	93.1	25.0	117.3	
3	105.6	10.0	115.5	
4	100.9	25.0	126.0	
5	57.3	10.0	66.9	
6	123.9	10.0	133.5	Subject had fever of 38-38.5°
7	123.9	25.0	148.5	
8	125.2	10.0	135.0	Subject had fever of 37-39°
9	125.2	25.0	149.7	

TABLE II

Determinations with casein as indicator.

Experiment III. On pure urea solution. Urea per 5 cc.

No.	Urea present in the solution. mg.	Urea found. mg.	Remarks.
1	25.0	24.3	Urea solution was diluted with 40 cc. of one per cent glucose solution instead of water.
2	25.0	24.6	
3	10.0	9.9	
4	2.5	2.4	
5	25.0	24.9	Diluted with 0.5 per cent sodium caseinate.
6	10.0	9.6	
7	2.5	2.4	
8	25.0	24.9	Diluted with 1.5% egg-white.
9	10.0	9.6	
10	2.5	2.4	

Experiment IV. On samples of urine, with or without addition of urea.

No.	Urea present in 5 cc. urine. mg.	Urea added. mg.	Urea found. mg.	Remarks.
1	81.0	6.0	86.1	Same sample
2	113.8	25.0	139.2	
3	82.5	—	—	
4	82.8	—	—	
5	82.5	—	—	Same sample
6	82.2	—	—	

Experiment V. Recovery of urea added to cow's milk.

No.	Urea present in 5 cc. of milk. mg.	Urea added. mg.	Urea recovered. mg.
1	2.0	50.0	52.5
2	1.9	50.0	51.9

The urea content of cow's milk.

The milk used in the present investigation was collected early in the morning, with special precautions to prevent contamination by dirt, brought to the laboratory and subjected to the analysis as quickly as possible. Number of cows tested was 38. Portions

of milk withdrawn from all the udders of the cows were well mixed. 10 cc. were measured out of the mixture, diluted with 40 cc. of water and digested with 3 cc. of the urease solution. All figures in the following tables represent the average of the three estimations. Samples with * are Pasteurized.

TABLE III.

Ration: 4 kilos of wheat bran, 2 kilos of tofu-kara, lees from the tofu manufacturing, 0.8 kilos of straw. From May 11, 4 kilos of wheat bran, 2.5—5 kilos of tofu-kara, 10 kilos of green grass.

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
I	1917	7	9	6		
	Apr. 30				1.030	0.033* 0.033
	May. 7				1.032	0.030* 0.027
	" 16				1.036	0.030* 0.018
	" 18				1.033	0.035* 0.030
II	Apr. 30	6	11	5	1.033	0.030* 0.030
	May. 7				1.034	0.027* 0.024
	" 16				1.036	0.033* 0.027
	" 18				1.032	0.030* 0.023
	" 20				1.036	0.039
	" 21			10	1.035	0.039
III	May. 1	11	9	6	1.036	0.036* 0.021
	" 6				1.031	0.027* 0.027
	" 15				1.033	0.027

The Urea Content of Cow's Milk.

75

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
	May. 17				1.036	0.024 0.024* 0.024
IV	May. 1	11	8	10	1.034	0.039* 0.032
	" 7				1.032	0.024* 0.021
	" 15				1.034	0.030* 0.021
	" 17				1.031	0.024* 0.024
V	May. 2	6	13	4	1.036	0.027* 0.015*
	" 5				1.036	0.027* 0.015*
	" 15				1.031	0.018* 0.018
	" 16				1.031	0.015
	" 18				1.032	0.015
	" 20				1.034	0.027
VI	May. 2	11	10	7	1.034	0.036* 0.036
	" 5				1.033	0.027* 0.024*
	" 16				1.034	0.038* 0.036
	" 16				1.031	0.036* 0.027*
VII	May. 1	8	7	10	1.037	0.036* 0.021
	" 6				1.033	0.027* 0.027*
	" 15				1.032	0.027

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
	May. 17				1.031	0.024* 0.024* 0.024
VIII	May. 9	4	12	8	1.035	0.030
	" 10				1.032	0.027
	" 11				1.034	0.027
	" 12				1.030	0.021
	" 13				1.031	0.021
	" 14				1.032	0.018
	" 17					

Ration: 9 kilos of wheat bran, 8 kilos of tofu-kara, 20 kilos of green grass, 4 kilos of straw.

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
IX	May. 23	11	10	8	1.030	0.027
	" 24				1.035	0.030
X	May. 22	6	8	10	1.027	0.036
	" 24				1.030	0.033
XI	May. 23	12	4	13	1.030	0.021
	" 24				1.031	0.027
XII	May. 26	8	11	9	1.029	0.024
	" 27				1.030	0.030
XIII	May. 26	5	12	9	1.032	0.030
	" 27				1.030	0.027
XIV	May. 26	11	2	15	1.033	0.015
	" 27				1.034	0.021

Ration: 8 kilos of wheat bran, 6-8 kilos of tofu-kara, 2 kilos of straw, 10 kilos of green grass.

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
XV	May. 31		11	4	1.030	0.012
	June. 1				1.030	0.015
XVI	May. 31		13	8	1.034	0.018
	June. 1				1.035	0.018
XVII	May. 31		8	12	1.030	0.021
	June. 1				1.035	0.024
XVIII	June. 2		3	15	1.030	0.036
	" 3				1.031	0.039
XIX	June. 2		6	9	1.031	0.018
	" 3				1.031	0.021

Ration: 5 kilos of wheat bran, 10 kilos of tofu-kara, 20 kilos of green grass.

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
XX	June. 1		2	6	1.031	0.021
	" 2				1.033	0.024
XXI	June. 1		3	16	1.032	0.027
	" 2				1.032	0.021
XXII	June. 1		8	12	1.033	0.030
	" 2				1.034	0.030
XXIII	June. 1		6	10	1.034	0.039
	" 2				1.035	0.036
XXIV	June. 2		2	16	1.033	0.042
	" 3				1.035	0.042

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
XXV	June. 2		6	10	1.029	0.021
	" 3				1.031	0.018
XXVI	June. 5				1.034	0.042
	" 6				1.035	0.042

Ration; 10 kilos of wheat bran, 8 kilos of toku-kara, 10 kilos of green grass, 2 kilos of straw.

Cow No.	Date.	Age of cow.	Months of lactation.	Daily amount of milk in litre.	Specific gravity of milk.	Urea gm. per 100 cc. of milk.
XXVII	June. 14	8	4	20	1.030	0.012
	" 15				1.033	0.015
XXVIII	June. 14	7	8	12	1.032	0.015
	" 15				1.034	0.021
XXIX	June. 15	7	11	10	1.034	0.018
	" 16				1.033	0.025
XXX	June. 15	7	2	16	1.030	0.030
	" 16				1.035	0.033
XXXI	June. 15	9	10	10	1.034	0.024
	" 16				1.035	0.024

Note. The daily amount of milk is not quite certain.

The amount of urea in cow's milk varies from 0.012 gm. to 0.042 gm. per 100 cc., but in most cases between 0.025 and 0.035 gm., the average content being 0.032 gm. This value is somewhat higher than that recorded by Camerer and Söldner (1898), and Denis and Minot (1919). It may be seen further that the process of Pasteurization lowers the urea content of milk.

Subsequently, changes in the urea content of milk after calving have been studied. Table IV summarizes the results obtained.

TABLE IV.

Gm. urea per 100 cc. of milk.

Days after Calving.	Cow XXXII. age = 12	Cow XXXIII. age = 8	Cow XXXIV. age = 5	Cow XXXV. age = 4	Cow XXXVI. age = 5	Cow XXXVII. age = 6	Cow XXXVIII. age = 6
4				0.045			
5			0.060	0.051			
6			0.054	0.030			
7		0.075	0.048	0.036	0.069		
8	0.045	0.057	0.042	0.033	0.066		
9	0.054	0.048	0.037	0.030	0.057		
10	0.045	0.033	0.036	0.033	0.057		
11	0.036	0.036	0.039	0.042	0.054		
12	0.030	0.033	0.054	0.030	0.045		
13	0.033	0.030	0.039	0.030	0.033		
14	0.033	0.030	0.042	0.045	0.030		
15	0.045	0.030	0.048	0.054			
16	0.048	0.030	0.033	0.044		0.036	
17	0.045	0.033	0.051	0.038		0.045	
18	0.042	0.030	0.045	0.036			
19	0.036	0.033	0.045	0.036			
20	0.033	0.027	0.066	0.018			
21			0.051	0.021			
22			0.051				
23			0.033				
24			0.024				
25			0.021				0.018
26			0.033				0.018

The figures reveal, differing from the statement of Camerer, a decidedly higher concentration of urea in the milk of a cow immediately after it has calved than in the normal milk. But it tends to become lower with lactating days and reaches the normal level within a month.

In the following experiments, samples collected in the evening were examined, in order to determine whether or not the physical exertion has any marked influence upon the urea content of milk.

TABLE V.

Date.	No. of Cow.	Urea per 100 cc. milk,
1917		<i>gm.</i>
Apr. 30	I	0.030
May. 18		0.039
" 16	II	0.032
" 18		0.030
" 15	III	0.024
" 17		0.018
" 1	IV	0.030
" 7		0.024
" 15	V	0.018
" 17		0.015
" 16	VI	0.048
" 18		0.036
" 1	VII	0.027
" 7		0.024
" 14	VIII	0.018
" 17		0.016
" 2	XXXII	0.027
" 3		0.051
" 3	XXXIII	0.051
" 4		0.036
" 5		0.037

The urea content of milk seems to rise slightly in the evening, but the difference is rather irregular and is within the limits of experimental error.

Urea content of goat's milk.

The milk tested was obtained from a goat which was fed daily 6-8 kilos of leaves of various Conifera and Rosaceae, 0.8 Kilo of Tofu-kara and 4 litres of saline water. The daily amount of milk was about 2 litres.

TABLE VI.

No.	Urea per 100 cc. milk.
1	0.084 <i>gm.</i>
2	0.083
3	0.087
4	0.086

The amount of urea in goat's milk averages 0.035 gm. per 100 cc.

REFERENCES

- Camerer, W. and Söldner, F. (1898); Zeitschr. f. Biol., **36**, 277.
See also Camerer, W. (1900): Zeitschr. f. Biol., **39**, 37.
 Denis, W. and Minot, A. S. (1919): Jl. of Biol. Chem., **37**, 353.
 Folin, O. and Denis, W. (1916): Jl. of Biol. Chem., **26**, 473.
 Kahn, R. L. (1916-17): Jl. of Biol. Chem., **28**, 203.
 Marshall, Jr., E. K. (1913): Jl. of Biol. Chem., **14**, 483.
 Stehle, R. L. (1921): Jl. of Biol. Chem., **47**, 13.
 Sumner, J. B. (1916): Jl. of Biol. Chem., **27**, 95.
 Youngburg, G. E. (1920-21): Jl. of Biol. Chem., **45**, 391.



BEITRÄGE ZUM PURINSTOFFWECHSEL.

I. Über das Schicksal des aufgenommenen Purins.

Von

MITZUGI KIRUCHI.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium, Tokyo Kaiserliche Universität,
Vorstand: Prof. Dr. S. Kakiuchi.)

(Eingegangen am 22. Dezember 1921)

INHALTSVERZEICHNIS.

- I. Einleitung.
- II. Untersuchungsplan und Methodik.
 - A. Gesamter Plan.
 - B. Die Materialien.
 - C. Die Ausscheidungen.
- III. Ergebnisse der Untersuchung.
 - A. Vorbemerkung.
 - B. Untersuchungsdata.
 - C. Zusammenfassende Betrachtung.
- IV. Über das physiologische Verhältnis zwischen aufgenommenen Nahrungspurinkernstoffen und den im Harn ausgeschiedenen Purinkernstickstoffen.
- V. Kritik über das Schicksal des aufgenommenen Purins.
- VI. Schluss.

I. EINLEITUNG.

Dank der Mühe der verschiedenen Autoren ist die Beziehung zwischen den Nahrungs- und Harn-Purinkörpern vielfach erörtert worden. Dass die Aufnahme sowohl nukleinreicher Nahrung als auch der Nukleinsäure und Purinbase die Vermehrung der Harnsäure im menschlichen Harn hervorruft, während sie in den

Säugetieren ausser dem Affen die Mehrausscheidung des Allantoins statt der Harnsäure herbeiführe (Wiechowski 1907, Schittenhelm u. Wiener), und dass der grösste Teil des aufgenommenen Methylpurins zur Purinbase des Harns übergehe (Burian u. Schur 1900) wird als festgestellt angenommen. Da aber auch bei der purinfreien Nahrung immer eine bestimmte Menge Harnsäure in den Harn übergeht, die fast individuell konstant erscheint, so wurde dieser Teil als endogene Harnsäure von der aus der Nahrung stammend angenommenen exogenen Harnsäure getrennt.

Dieser Gedanke des endogenen und exogenen Harnpurins wurde mit der genaueren Forschung von Burian u. Schur (1900) in weiteren Kreisen erkannt, und sowohl der individuelle Wert des endogenen Harnpurins als auch der exogene Bruchteil des aufgenommenen Purins von verschiedenen Autoren (Burian u. Schur, Brugsch u. Schittenhelm u.a.) angegeben.

Es ist nunmehr kein Zweifel darüber, dass ein Teil des Harnpurins aus dem Nahrungspurin abstamme, doch ist trotz der zahlreichen Untersuchungen noch nicht ganz klar, wie viele Teile des aufgenommenen Purins in den Harn übergehen. Aus der Meinung, dass diese Verhältnisse aus dem Einfluss der Menge des aufgenommenen Purins auf das ausgeschiedene Purin aufgeklärt werden mögen, unternahm ich unter Leitung von Prof. Dr. S. Kakiuchi eine Reihe von Selbstversuchen nach folgendem Plane.

II. UNTERSUCHUNGSPLAN UND METHODIK.

A. *Gesamter Plan.*

Der Einfluss der Menge des aufgenommenen Purins auf das ausgeschiedene Purin wurde ermittelt, indem man die Bestimmung der aufgenommenen und ausgeschiedenen Purinmenge sowohl bei purinarmer als auch verschiedener purinreicher Nahrung vergleicht.

TABELLE I.

Periode	Quelle d. Nahrungspurins	Dauer der Periode	Menge d. aufg. Purin-K-N
Purinarme Periode		17 Tage	0.00269 g
1. Rindfleischperiode	50 g Rindfleischpulver	6 „	0.10 „
2. „	100 g „	6 „	0.20 „
3. „	150 g „	6 „	0.30 „
1. Kalbsthymusperiode	16 g Kalbsthymuspulver	3 „	0.22 „
2. „	32 g „	3 „	0.44 „
3. „	48 g „	3 „	0.66 „

B. Die Materialien.

Die zur Aufnahme gekommene Nahrung bestand aus folgenden Materialien :

Polierter Reis. Gesamter zum Versuche gebrauchter polierter Reis wurde zur gleichen Verteilung gut zusammengemischt. Eine gewisse Menge davon wurde 5 mal gut ausgewaschen und dann gebraucht.

Kartoffel. Die Haut wurde dick abgeschält und der Centralteil gebraucht.

Hühnerei. Eier möglichst einerlei Art gekauft. Zur Bestimmung wurde eine gewisse Menge Ei davon möglichst gut zusammengerührt und analysiert.

Rindfleischpulver. Möglichst fettarmes Rindfleisch wurde nach der gewöhnlichen Methode zu feinem Pulver bereitet. 6176 g frisches Rindfleisch gab 1725 g (d.h. 28%) trocknes Fleischpulver.

Kalbsthymuspulver. Frischer Kalbsthymus wurde nach der gewöhnlichen Methode zu Pulver bereitet. 2152 g frischer, etwas befeuchteter Kalbsthymus gab 328 g (d.h. 15%) trocknes Thymuspulver.

Purinstickstoff von poliertem Reis, weissem Brot, Kartoffel wurde nach Burian u. Schur (1900), von Hühnerei nach Kossel, von Rindfleischpulver und Kalbsthymuspulver nach Burian u. Hall bestimmt.

Gesamter Stickstoff aller Nahrung wurde nach Kjeldahl bestimmt.

Eiweissgehalt der Nahrung wurde durch Multiplikation von Stickstoffgehalt mit 6,25 gewonnen, während Fett- und Kohlehydrategehalt der Nahrung, welcher bei unseren Versuchen nur sekundäre Bedeutung hatte, nach Mitteilungen aus dem Tokyo Hygienischen Institut (Tawara u.a. 1909) u.a. berechnet wurde.

Durch diese genannte Methode ermittelte Werte wurden in folgender Tabelle zusammengestellt.

TABELLE II.

Nahrung	Purin-N	Ges.-N	Kreatin	Eiweiss	Fett	Kohlehyd.
Polierter Reis	0,00029%	1,023%		6,4%	1,5%	76%
Kartoffel	0,00024%	0,355%		2,2%	0,1%	20%
Weissbrot	null	1,225%		7,7%	0,1%	50%
Hühnerrei	null	2,00%		12,5%	12,0%	—
Kuhmilch	0,00026%	0,55%		3,4%	3,5%	4,5%
Sojasauce	0,00088%	1,36%		8,5%	—	3%
Rindfleischpulv.	0,1976%	11,8%	1,435%	74,0%	15,0%	—
Kalbsthymuspulv.	1,720%	14,0%	Spur	87,7%		

C. Die Ausscheidungen.

Harn. Der Tagesharn wurde von Morgen 8 Uhr bis zum folgenden Morgen 8 Uhr gesammelt und tüchtig geschüttelt.

Kot. Die tägliche Menge Kot wurde mit etwa gleichem Teil Alkohol und weniger Menge verdünnter Schwefelsäure zusammengesetzt und dann auf dem Wasserbad bis zum Trocknen abgedampft. Der getrocknete Kot für 3 Tage wurde zusammengestampft und zu feinem Pulver gesiebt.

Im Harn wurde gesamter Purinstickstoff nach Camerer und Arnstein, Harnsäure- u. Purinbase-Stickstoff nach Salkowski, Kreatinin nach Folin (1904), Ammoniak- u. Harnstoff-Stickstoff nach Folin (1904), Van Slyke u. Cullen und Kanbe, Acidität nach Naegeli und Vozarik, gesamter Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Im Kot wurde der Purinstickstoff nach Krüger u. Schittenhelm (1905), gesamter Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Jeden Tag um 8 Uhr morgens wird das Körpergewicht nach der vollständigen Ausscheidung von Harn und Kot gewogen.

III. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG.

A. Vorbemerkung.

Bevor wir die Ergebnisse unserer Untersuchung betrachten, sei hier bemerkt, dass wir den Puringehalt aller Nahrung bestimmten, weil die bisher purinfrei benannte Nahrung nicht purinfrei, sondern nur purinarm im strengen Sinne ist. Ausserdem bestimmte ich auch das Kotpurin, obwohl die früheren Forscher die Purinbestimmung nur auf den Harn beschränkten, um bei unserem Falle über die Resorbierbarkeit und Darmausscheidung des Purins ein klares Bild zu bekommen.

Da die Purinbestimmung immer durch Ermittlung des Purinstickstoffs ausgeführt wurde, so bekommt man bei Aminopurin um $1/4$ mehr Stickstoffmenge, als bei Oxypurin, obgleich ihr Purinkernstickstoff (Fischer 1907) dieselbe Menge ist. Deshalb muss man bei der Vergleichung des aufgenommenen und ausgeschiedenen Purins mittels des ermittelten Purinstickstoffes nur mit ihrem Purinkernstickstoff (P-K-N.) vergleichen. So wird hier bei der Purinvergleichung Aminopurin mit 0,8 nach Wiechowski (1913), Oxypurin mit 1,0 multipliziert, um seinen Purinkernstickstoff zu bekommen: d.h. der Purinstickstoff purinarmer Nahrung, der als Pflanzen-Nukleinsäure bzw. nach Osborne u. Harris und Johnes als Aminopurin angenommen wird, und Purin-N. des Kalbsthymuspulvers, der hauptsächlich als Thymonukleinsäure bzw. nach Levene u. Jacobs als Aminopurin angenommen, Purin-N. des Kots, der nach Weintraud und Krüger u. Schittenhelm (1902) als Aminopurin angenommen, mit 0,8 multipliziert wird, um ihren P-K-N zu bekommen, während Purin-N des Rindfleischpulvers, der nach Burian u. Schur (1900)

hauptsächlich als Oxypurin angenommen wird, und Purin-N des Harns nach Krüger u. Salomon (1898-9) als Oxypurin angenommen, mit 1,0 multipliziert.

B. Untersuchungsdata.

TABELLE III. Aufgenommene Nahrung.

	Datum	Reis	Kart.	Ei	Brot	Milch	Soj.	Rdfl. od. Thy. pul.	Purin-N	Ges.- N	Kalor.
Purinnere Periode	22/X.	571	420	148	40	180			0,00244	11,72	3027
	23/X.	644	570	149	40	180			0,00298	13,10	3407
	24/X.	641	466	134		180			0,00277	11,87	3182
	25/X.	627	405	130	40	180			0,00262	11,90	3146
	26/X.	678	340	175	40	360			0,00296	14,08	3441
	27/X.	687	490	145		180			0,00292	12,63	3271
	28/X.	645	305	120	40	180			0,00243	11,68	3021
	29/X.	678	350	169	35	180			0,00262	12,91	3237
	30/X.	537	295	130	38	360			0,00256	11,56	2746
	28/XI.	624	360	150	20	360			0,00289	13,18	3101
	29/XI.	600	265	117	35	180			0,00228	10,85	2796
	30/XI.	600	315	138	8	180			0,00248	11,12	2812
	1/XII.	600	405	125	40	360			0,00291	12,57	3066
	2/XII.	600	430	119	60	180			0,00260	11,80	3010
	3/XII.	468	300	119	13	720			0,00314	12,36	2669
	4/XII.	600	240	203	35	180			0,00222	10,47	2912
	5/XII.	600	190	215	40	180			0,00213	10,59	2894
	Durchs.	606	326	144	31	254			0,00269	12,02	3032
I. Rindfleischperiode	6/XII.	600	385	120		180	11	50,00	0,10139	16,94	3026
	7/XII.	600	370	115	20	180	28	50,00	0,10149	16,94	3035
	8/XII.	650	275	110	20	90	27	50,00	0,10122	16,82	3097
	9/XII.	650	330	125		180	25	50,00	0,10130	17,54	3182
	10/XII.	650	270	132		180	32	50,00	0,10138	17,52	3140
	11/XII.	650	320	170		180	33	50,00	0,10152	18,51	3131
	Durchs.	630	326	129	3	165	26	50,00	0,10150	17,40	3102
Nachper.	12/XII.	600	370	129		180			0,00248	11,01	2904
	13/XII.	600	340	180		270			0,00261	12,41	3020
	14/XII.	430	285	177	50	360			0,00229	11,53	2521
	Durchs.	543	332	162	17	270			0,00246	11,65	2815

	Datum	Reis	Kart.	Ei	Brot	Milch	Soj.	Rdfl. od. Thy. pul.	Purin-N	Ges.- N	Kalor.
Vorperiode	16/I.	650	370	160		180			0,00267	11,74	3052
	17/I.	650	480	155		270			0,00293	12,92	3205
	18/I.	650	400	190	45	270			0,00233	13,88	3296
	19/I.	650	410	160		270			0,00285	12,77	3149
	Durchs.	650	420	166	11	248			0,00283	12,83	3176
II. Rindfleischper.	20/I.	650	505	145	25	180	22	100,00	0,20061	24,73	3651
	21/I.	650	380	168		180	20	100,00	0,20036	24,40	3519
	22/I.	650	390	110		90	30	100,00	0,20026	22,91	3377
	23/I.	650	445	118		144	17	100,00	0,20038	23,39	3474
	24/I.	650	450	155			17	100,00	0,19990	23,36	3437
	25/I.	650	460	163		180	32	100,00	0,20060	24,76	3587
	Durchs.	650	440	143	4	129	23	100,00	0,20038	23,93	3508
Nachper.	26/I.	650	370	170		180	11		0,00268	12,48	3010
	27/I.	650	490	225			8		0,00232	12,48	3010
	28/I.	650	370	225			8		0,00239	12,55	3042
	Durchs.	650	410	207		60	9		0,00250	12,66	3088
Vorper.	13/II.	650	380	225	12	180	4		0,00264	13,67	3196
	14/II.	650	405	168	80	180	3		0,00268	13,44	3287
	15/II.	650	310	205	80	360	12		0,00292	14,95	3388
	Durchs.	650	365	199	57	240	6		0,00277	14,02	3290
IV. Rindfleischper.	16/II.	700	425	110		180	20	150,00	0,29936	29,81	3855
	17/II.	700	500	110		180	20	150,00	0,29951	30,08	3929
	18/II.	700	410	112		180	20	150,00	0,29933	29,80	3898
	19/II.	700	325	112		180	25	150,00	0,29919	29,57	3773
	20/II.	700	400	113		180	39	150,00	0,29943	30,04	3845
	21/II.	700	370	110		90	23	150,00	0,29910	29,16	3752
	Durchs.	700	405	111		165	25	150,00	0,29932	29,74	3836
Nachper.	22/II.	650	400	230		90	16		0,00263	13,36	3138
	23/II.	650	310	210	80		18		0,00224	13,16	3153
	24/II.	650	315	210			20		0,00226	12,22	2963
	Durchs.	650	342	217	27	30	18		0,00246	12,91	3086
Vorperiode	3/V.	650	500	133		180				12,36	2981
	4/V.	650	380	170		180			0,00260	11,85	2966
	5/V.	650	330	153		180			0,00250	11,63	2782
	6/V.	650	70	193		180			0,00201	11,63	2792
	Durchs.	650	320	162		180			0,00235	11,99	2963
I. Thym- per.	7/V.	650		191		90	45	16,00	0,22180	13,79	2720
	8/V.	650		130		180	50	16,00	0,22200	13,15	2680
	9/V.	650		135		180	45	16,00	0,22200	13,17	2687
	Durchs.	650		152		150	47	16,00	0,22190	13,35	2694

	Datum	Reis Kart.	Ei	Brot	Milch	Soj.	Rdfl. od. Thy. pul.	Purin-N	Ges.- N	Kalor.
Zwisch. per.	10/V.	650	138		180	45		0,00218	10,99	2695
	11/V.	650	160		180	40		0,00215	11,36	2634
	12/V.	650	146		180	35		0,00212	11,02	2669
	Durchs.	650	148		180	40		0 00215	11,12	2650
II. Thy.m. per.	13/V.	650	140		180	61	32,00	0,44230	15,73	2755
	14/V.	650	145		180	48	32,00	0,44220	15,58	2760
	15/V.	650	135		180	48	32,00	0,44220	15,45	2745
	Durchs.	650	140		180	51	32,00	0,44220	15,59	2753
Zwisch. per.	16/V.	650	176		180	61		0,00231	11,79	2699
	17/V.	650	188		180	45		0,00218	11,99	2710
	18/V.	650	170		90	45		0,00200	11,13	2623
	Durchs.	650	178		150	50		0,00216	11,70	2631
III. Thymp. per.	19/V.	650	150		180	64	48,00	0,66232	18,21	2828
	20/V.	650	155		180	53	48,00	0,66225	18,16	2836
	21/V.	650	145		180	47	48,00	0,66225	17,88	2818
	Durchs.	650	150		180	55	48,00	0,66227	18,08	2828
Nachper.	22/V.	650	192		180	27		0,00206	11,83	2720
	23/V.	650	187			37		0,00176	10,88	2597
	24/V.	650	243		180	57		0,00224	13,23	2807
	Durchs.	650	207		120	40		0,00203	11,98	2746

TABELLE IV. Ausscheidungen.

	Datum	Kreati- nin	Purin-N.			Gesamt.-N		
			Harn-P-N	Kot-P-N	P-K-N	Harn-N	Kot-N	Ges.-N
Purinarme Periode	22/X.	1,088	0,206	0,063	0,2564	9,25	1,98	11,23
	23/V.	0,958	0,191	0,063	0,2414	9,17	1,98	11,15
	24/V.	0,823	0,1775	0,063	0,2279	10,00	1,98	11,98
	25/V.	0,155	0,172	0,076	0,2330	8,54	2,27	10,81
	26/V.	0,782	0,180	0,076	0,2410	8,67	2,27	10,94
	27/V.	1,288	0,1985	0,076	0,2595	9,25	2,27	11,53
	28/X.	1,071	0,1855	0,064	0,2367	8,12	2,09	10,21
	29/X.	1,250	0,193	0,064	0,2442	8,77	2,09	10,86
	30/X.	0,010	0,1845	0,064	0,2357	8,76	2,09	10,85
	28/XI.	1,052	0,193	0,054	0,2363	10,15	1,98	12,13
	29/XI.	0,911	0,138	0,054	0,1813	8,92	1,98	10,90
	30/XI.	0,979	0,172	0,054	0,2153	9,00	1,98	10,98
	1/XII.	1,147	0,182	0,062	0,2317	8,88	1,80	10,68

	Datum	Kreati- nin	Purin-N			Gesamt.-N		
			Harn-P-N	Kot-P-N	P-K-N	Harn-N	Kot-N	Ges.-N
Purinarme Periode	2/XII.	1,421	0,208	0,062	0,2557	9,05	1,80	10,85
	3/XII.	1,176	0,160	0,062	0,2097	8,70	1,80	10,50
	4/XII.	1,002	0,160	0,0615	0,2092	9,13	2,04	11,17
	5/XII.	1,116	0,168	0,0615	0,2472	10,85	2,04	12,89
	Durchs.	1,101	0,1764	0,059	0,2237	9,31	1,93	11,27
I. Rindfleischper.	6/XII.	1,364	0,234	0,0683	0,2888	12,43	1,59	14,02
	7/XII.	1,488	0,264	0,0683	0,3188	12,43	1,59	14,02
	8/XII.	1,556	0,271	0,0428	0,3053	14,42	2,54	16,96
	9/XII.	1,408	0,257	0,0438	0,2913	14,85	2,54	17,39
	10/XII.	1,219	0,233	0,0690	0,2882	13,66	1,89	15,55
	11/XII.	1,536	0,259	0,0690	0,3142	14,12	1,89	16,01
	Durchs.	1,429	0,253	0,0600	0,3010	13,65	2,00	15,65
Nachper.	12/XII.	1,085	0,171	0,0660	0,2210	10,92	1,94	12,86
	13/XII.	1,244	0,153	0,0660	0,2110	10,46	1,94	12,40
	14/XII.	1,085	0,217	0,0660	0,2700	10,40	1,94	12,34
	Durchs.	1,138	0,182	0,0660	0,2350	10,59	1,94	12,53
Vorper.	16/I.	0,978	0,2040	0,043	0,2381	8,81	1,78	10,59
	17/I.	0,991	0,215	0,043	0,2494	10,12	1,78	11,90
	18/I.	0,958	0,216	0,043	0,2504	8,10	1,78	9,88
	19/I.	0,09	0,216	0,043	0,2504	10,40	1,78	12,18
	Durchs.	1,004	0,210	0,043	0,2444	9,36	1,78	11,14
II. Rindfleischper.	20/I.	1,865	0,303	0,054	0,3163	14,40	2,78	17,18
	21/I.	1,932	0,254	0,054	0,2973	15,62	2,78	18,40
	22/I.	1,877	0,322	0,062	0,3717	16,71	3,32	19,73
	23/I.	1,823	0,386	0,062	0,4357	19,87	3,02	22,89
	24/I.	1,690	0,269	0,063	0,3405	18,20	2,60	20,80
	25/I.	2,090	0,380	0,063	0,4305	19,33	2,60	21,93
	Durchs.	1,880	0,319	0,060	0,3671	17,33	2,80	20,16
Nachper.	26/I.	1,091	0,161	0,059	0,2082	11,32	2,16	13,48
	27/I.	1,078	0,193	0,059	0,2403	10,80	2,16	12,86
	28/I.	1,099	0,175	0,059	0,2222	8,35	2,16	10,46
	Durchs.	1,089	0,176	0,059	0,2232	10,16	2,16	12,32
Vorper.	13/II.	1,215	0,240	0,0620	0,2895	11,60	2,24	13,84
	14/II.	0,817	0,132	0,0620	0,1845	9,55	2,24	11,79
	15/II.	1,368	0,191	0,0620	0,2405	11,30	2,24	13,54
	Durchs.	1,133	0,188	0,0620	0,2375	10,81	2,24	13,06

	Datum	Kreati- nin	Purin-N			Gesamt-N		
			Harn-P-N	Kot-P-N	P-K-N	Harn-N	Kot-N	Ges-N
III. Rindfleischper.	16/II.	2,340	0,392	0,0673	0,4458	18,50	3,11	21,61
	17/II.	2,540	0,425	0,0673	0,4788	22,20	3,11	25,31
	18/II.	2,610	0,405	0,0770	0,4668	20,10	2,88	22,98
	19/II.	2,335	0,366	0,0770	0,4278	22,20	2,83	25,08
	20/II.	1,759	0,436	0,0601	0,4845	22,40	3,87	26,27
	21/II.	2,061	0,3902	0,0601	0,4287	22,60	3,87	26,47
	Durchs.	2,276	0,4007	0,0681	0,4554	21,33	3,29	24,62
Nachper.	22/II.	1,035	0,2385	0,0660	0,3364	14,60	2,13	16,73
	23/II.	1,189	0,1985	0,0660	0,2514	11,20	2,13	13,33
	24/II.	1,165	0,2564	0,0660	0,3093	11,41	2,13	13,33
	Durchs.	1,130	0,2461	0,0661	0,2990	12,40	2,13	14,53
Vo-per	3/V.	0,82	0,2010	—	—	9,90	—	—
	4/V.	0,67	0,1940	0,0402	0,2262	10,75	2,10	12,85
	5/V.	0,77	0,1640	0,0402	0,1962	7,85	2,10	9,95
	6/V.	0,99	0,1850	0,0402	0,2172	9,20	2,10	11,30
	Durchs.	0,81	0,1810	0,0402	0,2132	9,43	2,10	11,53
I. Thym. per.	7/V.	0,795	0,2824	0,0600	0,3304	11,86	2,05	13,91
	8/V.	0,935	0,3650	0,0600	0,4130	11,95	2,05	14,00
	9/V.	0,940	0,4170	0,0600	0,4650	9,40	2,05	11,45
	Durchs.	0,890	0,3548	0,0600	0,4028	11,07	2,05	13,12
Zwisch. per.	10/V.	0,860	0,2955	0,0474	0,3344	10,60	1,72	12,32
	11/V.	0,920	0,2415	0,0476	0,2794	10,70	1,72	12,42
	12/V.	0,940	0,2158	0,0474	0,2537	10,50	1,72	12,22
	Durchs.	0,907	0,2509	0,0474	0,2888	10,60	1,72	12,32
II. Thym. per.	13/V.	1,025	0,4376	0,0454	0,4739	11,95	2,04	13,99
	14/V.	1,120	0,5165	0,0454	0,5523	13,70	2,01	15,74
	15/V.	1,000	0,4970	0,0454	0,5333	13,10	2,04	15,24
	Durchs.	1,048	0,4837	0,0454	0,5200	12,95	2,04	14,99
Zwisch. per.	16/V.	0,766	0,2970	0,030	0,3210	10,20	1,13	11,33
	17/V.	0,990	0,2100	0,030	0,2340	11,30	1,13	12,43
	18/V.	0,946	0,1760	0,030	0,2000	9,35	1,13	10,48
	Durchs.	0,900	0,2277	0,030	0,2517	10,28	1,13	11,41
III. Thym. per.	19/V.	1,035	0,4840	0,050	0,5240	14,20	2,22	16,42
	20/V.	1,060	0,6140	0,050	0,6540	13,30	2,22	15,52
	21/V.	1,010	0,5745	0,050	0,6145	14,40	2,22	16,62
	Durchs.	1,052	0,5575	0,050	0,5975	13,97	2,22	16,19

	Datum	Kreati- nin.	Purin-N			Gesamt-N		
			Harn-P-N	Kot-P-N	P-K-N	Harn-N	Kot-N	Ges.-N
Nach. per.	22/V.	0,915	0,2630	0,045	0,2990	15,50	1,80	12,30
	23/V.	0,890	0,2150	0,045	0,2510	9,25	1,80	11,05
	24/V.	1,070	0,2240	0,045	0,2600	12,35	1,80	14,15
	Durchs.	0,953	0,2340	0,045	0,2700	10,70	1,80	12,50

C. Zusammenfassende Betrachtung.

Aus obiger Tabelle können wir folgende Tatsachen zusammenstellen.

1. Die endogene Ausscheidung des Harnpurinkernstickstoffes bleibt während der Versuche ganz konstant. Sie betrug ca. 0,18 g. Auch bei vielen anderen Autoren ist der endogene Harnkernstickstoff individuell fast konstant und liegt am häufigsten zwischen 0,2 und 0,1 g. Bei neuerer Untersuchung von W. C. Rose scheint dieser Wert von der Natur und Menge der Nahrung abhängig zu sein.

2. Sowohl in der purinarmen als auch in der ganz purinreichen Nahrung hat die Menge des Kotpurinstickstoffes fast denselben Wert (ca. 0,05 g pro Tag). Dies zeigt, dass das aufgenommene Nahrungspurin fast vollständig resorbiert wird. Dasselbe Verhältnis wurde auch schon von früheren Autoren beobachtet.

3. Wenn der Purinstickstoff in der Nahrung sich vermehrt, so steigt auch die Menge des ausgeschiedenen Harnstickstoffes. Der Unterschied dieser beiden Werte vermindert sich jedoch immer mehr, bis endlich der Purinansatz erfolgt, was aus folgenden Durchschnittszahlen und Diagramm I, übersichtlich wird.

TABELLE V.

Periode	Aufg. P-K-N	Ausg. Harn P-K-N	P-K-N.-Bilanz
Purinarme Periode.	0,00257	0,1822	-0,17943
1. Rindfleischper.	0,10152	0,253	-0,15148
1. Kalbsthymusper.	0,2219	0,3548	-0,1329
3. Rindfleischper.	0,29932	0,4007	-0,10138
2. Kalbsthymusper.	0,4422	0,4837	-0,0415
3. „	0,66227	0,5575	+0,10477

4. Der täglich aufgenommene Purinkernstickstoff bei der purinarmen Nahrung war 0,00257 g und betrug nur ungefähr 1,1% des dabei täglich ausgeschiedenen sog. endogenen Purinkernstickstoffes (0,233 g).

5. Der grösste Teil des aufgenommenen Purins scheidet an demselben Tage aus, aber ein kleiner Teil scheidet noch in einigen direkt nachfolgenden Tagen aus. Diese nachträgliche Ausscheidung wurde auch von vielen Autoren beobachtet.

6. Bei der vermehrten Purinaufnahme bemerkt man keine nennenswerte Steigerung der Harnpurinbase.

7. Die endogene Ausscheidung des Kreatinins war in meinem Falle ca. 1,1 g. Wenn dass aufgenommene Kreatin u. Kreatinin sich vermehrt, so steigert sich auch seine Ausscheidung, wie es Gruber und Klercker schon beobachteten, aber der Unterschied beider vermindert sich immer mehr, wie folgende Durchschnittszahlen zeigen :

TABELLE VI.

Periode	Aufg. Kreatinin. u. Kreatinin.	Ausg. Kreatinin	Kreatinin- Bilanz	Aufg. P-K-N	Aufg.-N
Purinarme Periode	0,00257	1,090	—1,090	0,00257	12,38
1. Thymusperiode	0,00	0,89	—0,89	0,2219	13,35
2. „	0,00	1,048	—1,048	0,4422	15,59
3. „	0,00	1,052	—1,052	0,6623	18,08
1. Fleischperiode	0,718	1,429	—0,711	0,1015	17,40
2. „	1,435	1,880	—0,455	0,2003	23,93
3. „	2,153	2,276	—0,123	0,2993	29,74

Aus der Untersuchung bei der Thymusperiode ist es klar, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem endogenen Kreatin und Purin, wie Burian angab, kaum annehmbar ist. Aus dieser Tabelle geht auch hervor, wie Folin (1905) angab, dass sowohl Purin als auch Kreatinin keinen direkten Zusammenhang mit der Stickstoffmenge im Harn haben.

8. Die ganze Untersuchungsperiode hindurch befand sich die Versuchsperson in ganz normalem Zustande. Das Stickstoffgleichgewicht wurde immer beibehalten, ja oft deutlicher Stickstoffansatz

beobachtet, und das Körpergewicht war während derselben Periode fast konstant geblieben. Die Nahrungskalorien wurden nach dem Appetit zwischen 2700 und 3800 beliebig gehalten, um sie mehr dem natürlichen Leben anzupassen. Diese alle verhielten sich folgendermassen:

TABELLE VII.

Periode	Stickstoffgleichgewicht			Körpergewicht		Aufg. Nahr.- Kal. Dur- chsch.
	Aufg. N	Ausg. N	N.-Bilanz	Anfang	Ende	
Purinarme Periode	12,38	11,06	+1,32	66920	66950	3164
1. Fleischperiode	17,42	15,65	+1,77	65850	65200	3102
2. „	23,93	20,16	+3,77	65300	65350	3509
3. „	29,47	24,62	+5,12	65050	66000	3836
1. Thymusperiode	13,35	13,12	+0,23	65150	66140	2695
2. „	15,59	14,99	+0,60	65450	65350	2757
3. „	18,08	16,19	+1,89	65150	64850	2826

V. ÜBER DAS PHYSIOLOGISCHE VERHÄLTNIS ZWISCHEN DEN
AUFGENOMMENEN NÄHRUNGSPURINKERNSTICKSTOFFEN
UND DEN IM HARN AUSGESCHIEDENEN
PURINKERNSTICKSTOFFEN.

Wenn man die Beziehung zwischen den aufgenommenen und ausgeschiedenen Harnpurinkernstickstoffen erforschen will, muss man zuerst über die Momente der Ausscheidung der Purinkörper klar sein.

Die Purinkörper im Harn werden natürlich wie andere Harnbestandteile vom Blut aus in den Harn ausgeschieden, und ihre Menge ist von der im Blute enthaltenen Menge abhängig. Zugleich ist da immer ein gewisses Gleichgewicht zwischen Blut und Gewebe.

Wenn also irgend eine Substanz im Gewebe in mobilisierbaren Zustand verwandelt wird, so wächst seine Menge im Blut an, während anderseits Vermehrung einer Substanz im Blut sowohl ihre Retention im Gewebe als auch ihre Ausscheidung in den Harn verursachen kann. Nun ist das sog. endogene Purin diejenige Purinmenge, welche bei purinfreier Nahrung während eines Tages vom Blut aus in den Harn ausgeschieden wird, und stellt

eine Funktion von der Menge des zirkulierenden Blutpurins dar. Wenn man eine purinhaltige Nahrung aufnimmt, wird das darin enthaltene Purin allmählich durch die Darmwand in das Blut resorbiert und dadurch wird das zirkulierende Purin um soviel vermehrt. Für das Purin im Nahrungsmittel können wir daher den gleichen Wert als Faktor der Harnpurinausscheidung wie die Purinmenge des Blutes bei purinfreier Nahrung annehmen. Dabei entsteht aber zugleich die Bedingung, dass mit der Vermehrung des Blutpuringehalts die Verteilung des Purins zwischen Gewebe und Blut verändert wird.

Solcher Betrachtung zufolge können wir die ausgeschiedene Purinmenge mit der folgenden Funktion ausdrücken, indem man das ausgeschiedene Harn-P-K-N als eine Funktion von dem zirkulierenden Blutpurin, das letztere aber als eine Funktion des von Gewebe und von der Nahrung abstammenden Purins annimmt.

$$Y=f[\varphi(E, X)]$$

wo Y =Täglich vom* Blut in den Harn übergegangenes P-K-N.

E =Täglich vom Gewebe in das Blut übergegangenes P-K-N.

X =Täglich von der Nahrung in das Blut übergegangenes P-K-N.

$\varphi(E, X)$ =Täglich im Blut kreisendes P-K-N.

Und so stelle ich folgende Funktionen auf, indem ich die Menge des vom Gewebe abstammenden Purins zuerst als konstant annehme :

$$Y=a\varphi(E, X)$$

$$\varphi(E, X)=(E+X)(1+bX+cX^2+\dots)$$

Daher
$$Y=a(E+X)(1+bX+cX^2+\dots)$$

Hier ist a der Nierenkoeffizient, während b, c, \dots Gewebskonstanten ausdrücken.

Wenn $X=0$, wie bei purinfreier Nahrung, dann

$$Y=aE=E_0$$

E_0 ist endogenes Purin d.h. täglich vom Blut in den Harn übergegangenes P-K-N bei purinfreier Nahrung.

Um den Wert der Konstanten aus meinen Resultaten zu erhalten, nehmen wir der Einfachheit halber eine abgekürzte Formel

$$Y = (E_0 + ax) (1 + bX)$$

und aus den folgenden experimentellen Daten wurde nun der Wert von a und b berechnet.

$$a = 0,99$$

$$b = -0,5$$

Folglich

$$Y = (0,18 + 0,99X) (1 - 0,5X)$$

TABELLE VIII.

Periode	Aufg. P-K-N (X)	Ausgesch. Harn P-K-N. (Y)
Purinarme Periode	0,0026	0,1822
1. Rindfleischperiode	0,1015	0,2530
2. „	0,2004	0,3190
1. Kalbsthymusperiode	0,2219	0,3548
3. Rindfleischperiode	0,2993	0,4007
2. Kalbsthymusperiode	0,4422	0,4837
3. „	0,6623	0,5575

Wenn wir den aus dieser Formel berechneten Wert des ausgeschiedenen Harn-P-K-N mit dem des gefundenenen Harn-P-K-N in meinem Falle vergleichen, dann kann man ziemlich gute Übereinstimmung zwischen beiden finden, wie es folgende Tabelle bezeichnet.

TABELLE IX.

Aufgen. P-K-N (X)	Ausgeschiedenes Harn-P-K-N (Y)	
	(gefunden)	(berechnet)
0,0026	0,1822	0,1824
0,1015	0,2530	0,2663
0,2004	0,3190	0,3406
0,2219	0,3548	0,3553
0,2993	0,4007	0,4049
0,4422	0,4837	0,4813
0,6623	0,5575	0,5599

Und es scheint mir, wie ich demnächst berichten werde, dass der Nierenkoeffizient (a) grösser bei an purinarne Nahrung gewöhnten Individuen (z.B. Japanern, wahrscheinlich Polen und einigen Amerikanern) als bei der an purinreiche Nahrung gewöhnten (z.B. wahrscheinlich Engländern, Deutschen, Oesterreichern u.a.) ist und äusserst klein bei Gichtikern, und zwar mit der Schwere der Koeffizient desto kleiner werdend. Die Gewebskonstante (b) ist ungefähr 0,4–0,5, obgleich sie bei einigen Individuen ziemlich abweicht.

V. KRITIK ÜBER DAS SCHICKSAL DES AUFGENOMMENEN PURINS.

In der Frage über das Schicksal des aufgenommenen Purins wurde schon früher das Wort „exogener Bruchteil“ angegeben. Obgleich er von verschiedenen Autoren erforscht worden ist, so ist betreffs desselben doch bis jetzt noch keine systematische Übereinstimmung gefunden worden.

Was bedeutet nun der exogene Bruchteil? Er ist von Burian u. Schur (1900) als

$$(Y - E_0)/X$$

wo X = Aufgenommenes Purin

E = Endogenes Harnpurin

Y = Gesamt-Harnpurin

angegeben worden. Da es aber ganz unmöglich ist, das im Blut zirkulierende Purin in endogenes und exogenes zu trennen, so ist es auch undenkbar, dass nur endogenes Blutpurin immer in toto in den Harn übergehe, während das exogene Blutpurin nur teilweise in den Harn austrete.

Weil das im Gewebe mobilisierbar werdende Purin ein Zelltächtigkeitsprodukt (Mares) oder Zellzerstörungsprodukt (Horbaszewski u.a.) ist, mag es ohne Einfluss auf die Schwankung der Blutpurinmenge sein.

Sein Übergang in das Blut muss aber eine Funktion der Blutpurinmenge beziehungsweise des aufgenommenen Purins sein.

Wie hier erklärt, hat der Ausdruck „exogener Bruchteil“ sowohl

theoretisch als auch experimentell deutlich 2 Fehler; erstens gibt er dem endogenen und exogenen Purin im Blut als Faktor der Harnpurinausscheidung gesonderte Werte, und zweitens lässt er den wegen der vermehrten Zufuhr des aufgenommenen Purins ins Blut zwischen dem Blut und Gewebe stattfindenden Vorgang ausser acht. So zeigt er in demselben Individuum auch ganz bedeutungslose breite Schwankung, wie aus folgender Tabelle und Diagramm III hervorgeht.

TABELLE X.

Aufgen. P-K-N	Ausgeschied. Harn P-N-K (korrig. mit Nachaussch.)	Exogener Bruchteil $(Y-E)/X$
0,00	0,18	Unbestimmt
0,1015	0,253	0,73
0,2004	0,319	0,70
0,2993	0,4338	0,85
0,4422	0,5314	0,79
0 6623	0,6115	0,65

Diskutiert man von diesem Grunde aus die früheren Angaben über das Schicksal des aufgenommenen P-K-N, dann ergibt sich folgendes:

1. Burian u. Schur gaben zuerst (1900) an, dass der exogene Bruchteil nach den Nahrungsarten verschiedenen Wert habe. Aber der exogene Bruchteil hat bei derselben Nahrung auch verschiedenen Wert, wie oben erklärt. Ausserdem beruht der scheinbare Unterschied des exogenen Bruchteils nach den Nahrungsarten (Oxypurin u. Aminopurin) tatsächlich auf dem Mengeneinfluss des aufgenommenen Purins (er war grösser bei der Aufnahme kleiner Mengen Oxypurin, kleiner bei der Aufnahme einer grösseren Menge Aminopurin), wie man aus den Untersuchungsdaten leicht berechnen kann. Später (1903) negierten sie selbst diese Angabe.

2. Kaufmann u. Mohr gaben an, dass der exogene Bruchteil sowohl nach dem Individuum als auch bei demselben Individuum zeitweise verschieden ist, und sie erklärten diese individuelle Verschiedenheit mit individueller Disposition und die

zeitweise Verschiedenheit bei demselben Individuum mit momentaner Disposition. Ihr Ausdruck „individuelle Disposition“ lässt die individuelle Verschiedenheit der Nierenkoeffizienten, und der „momentane Disposition“ die lineare Funktion von exogenem Einfluss vermuten, obgleich sie bei ihrer Angabe keine systematische Regel gefunden hatten.

3. Burian u. Schur führten den Ausdruck „Integrativfaktor“ in einer späteren Mitteilung (1903) ein. Sie bemerkten, dass die Durchschnittszahl des exogenen Bruchteils von verschiedenen Menschen fast 0,5 und die der Kaninchen und Hunde verhältnismässig kleiner als die bei Menschen ist, und sie gaben an, dass der Integrativfaktor (der dem $\frac{1}{\text{exogenen Bruchteil}}$ entspricht und Zerstörungsfaktor bedeutet) im Menschen 2, in Kaninchen 6, in Karnivoren 20–30 sei.

Wenn sie aber das Schicksal des aufgenommenen Purins in Säugetieren erforscht haben, so mussten sie das Allantoin berücksichtigen und wenn sie Allantoin-N als P-K-N berechnet hätten, dann würden sie kaum merkbare Unterschiede des Integrativfaktors zwischen Menschen, Kaninchen und Hunden gefunden haben. Und ausserdem ist es noch nicht entschieden, ob das aufgenommene P-K-N ausser der Harnsäureausscheidung nicht auch noch anderweitig zerstört wird.

4. Wenn irgend eine Purinolyse in dem Darm, wie Thalhäuser u. Dorfmueller angeben, vorhanden ist, dann müssen a und b in der Formel $Y = (E_0 + aX) (1 + bX)$ je ein Gemenge von Darmkoeffizient und Nierenkoeffizient, bzw. Gewebskonstanten zeigen. Aber das ist noch keine gesicherte Angabe.

VI. SCHLUSS.

1. Die Menge des ausgeschiedenen Purins im Harn bei verschiedener Purinaufnahme kann nach folgender Formel berechnet werden.

$$Y = (E_0 + aX) (1 + bX)$$

wo

- X ein aufgenommener Purinkernstickstoff,
Y ein ausgeschiedenes Harn-P-K-N,
E₀ endogenes ausgeschiedenes Harn-P-K-N,
a Nierenkoeffizient,
b Gewebskonstante
ausdrücken.

a und b können individuell verschieden sein, u.z. a scheint bei dem an purinarme Nahrung gewöhnten Individuum grösser als bei dem an purinreiche Nahrung gewöhnten, und besonders klein bei dem Gichtiker zu sein. Der Wert b liegt gewöhnlich zwischen 0,4 und 0,5.

2. Wie die obige Formel zeigt, ist die ausgeschiedene Harnpurinmenge in demselben Individuum nur von der Menge des aufgenommenen Nahrungspurins abhängig.

3. Es scheint mir gänzlich unnötig, einen exogenen Bruchteil und seine Abhängigkeit von der momentanen Änderung der Disposition anzunehmen.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, dem Vorstand unseres Instituts, Herrn Prof. Dr. Kakiuchi, für seine freundliche Leitung und weitgehende Hilfe bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

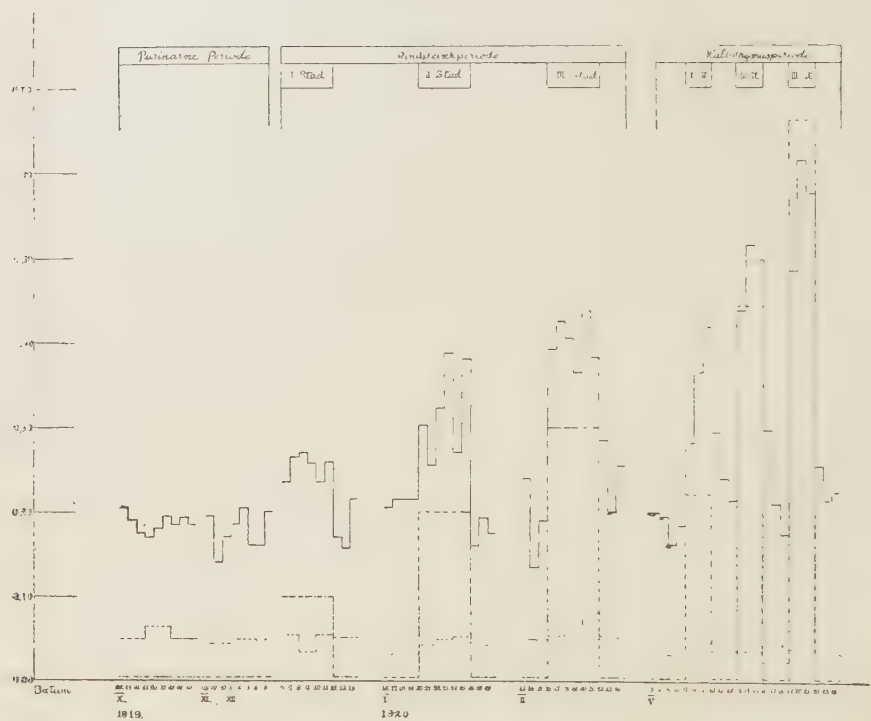
LITERATUR.

- Arnstein (1897). Über die Bestimmung der Xanthinbasen im Harn. Zeits. f. physiol. Chem., **23**, 417.
Brugsch u. Schittenhelm (1907-8). Zur Stoffwechselpathologie der Gicht. Zeits. exp. Path. u. Therap., **4**, 438-551.; **5**, 215.
Burian u. Schur (1900). Über die Stellung der Purinkörper im menschlichen Stoffwechsel.: Pflüger's Archiv f. gesam. Physiol., **80**, 241.
Burian u. Schur (1903). Die intermediäre Natur der Purinkörper beim Säugetierstoffwechsel. Pflüger's Archiv f. ges. Phys., **87**, 239.
Burian u. Hall (1903). Die Bestimmung der Purinstoffe in tierischen Organen mittels der Methods des korrigierten Wertes. Zeits. f. phys. Chem., **33**, 336.
Camerer (1890). Die quantitative Bestimmung der Harnsäure im menschlichen Urin. Zeits. f. Biologie., **26**, 104.

- Folin (1904). Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harn. *Zeits. f. physiol. Chem.*, **41**, 223.
- Folin (1905). A theory of proteinmetabolism. *Amer. Jour. of Physiol.*, **13**, 83 u. 118.
- Gruber (1902). Einige Bemerkungen über den Eiweissstoffwechsel. *Zeits. f. Biologie*, **2**, 407.
- Horbaczewski (1889). Untersuchungen über die Entstehung der Harnsäure im Säugetierorganismus. *Monatsh. f. Chem.* **10**, 624.
- Johnes (1914). Nucleic acid, p. 26-38.
- Kaufmann u. Mohr (1902). Beiträge zur Alloxurkörperfrage und zur Pathologie der Gicht. *Deutsches Archiv f. klin. Med.*, **74**, 141.
- Kanbe (1916). Die Bestimmung des Harnstoffes durch Urease. *Mitteil. d. Med. Gesellsch. zu Tokyo*, **30**, 615.
- Kjeldahl (1883, 1892). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeits. f. analytische Chemis*, **22**, 366. (1883). **31**, 451.
- Klercker (1906). Zur Frage der Kreatin- u. Kreatininausscheidung beim Menschen. *Hofmeister's Beiträge*, **8**, 59.
- Kossel (1882, 1886). Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns. *Zeits. f. physiol. Chem.*, **7**, 197.; **10**, 248.
- Krüger u. Salomon (1898-9). Die Alloxurbasen des Harns. *Zeits. f. phys. chem.* **24**, 364, **26**, 350.
- Krüger u. Schittenhelm (1902). Die Purinkörper der menschlichen Fäces. *Zeits. f. physiol. Chem.*, **35**, 153.
- Krüger u. Schittenhelm (1905). Die Menge und Herkunft der Purinkörper in den menschlichen Fäces. *Zeits. phys. Chem.*, **45**, 14.
- Landau (1909). Beiträge zu Lehre vom Purinstoffwechsel und zur Frage über den Alkoholeinfluss auf die Harnsäureausscheidung. *Deutsches Archiv f. klin. Med.*, **95**, 280.
- Levene u. Jacobs (1912). On the structure of thymus nucleic acid. *J. of Biol. Chem.*, **12**, 411.
- Mares (1910). Der physiologische Protoplasmastoffwechsel und die Purinbildung. *Pflüger's Archiv f. ges. Physiol.*, **134**, 59.
- Naegeli (1900). Zur Aciditätbestimmung des Urins. *Zeits. f. phys. Chem.*, **30**, 313.
- Osborne u. Harris (1902). Die Nukleinsäure des Weizenembryos. *Zeits. f. phys. Chem.*, **36**, 85.
- Rose, W. C. (1921): The influence of food ingestion upon endogenous purin metabolism. *Journ. of Biol. Chem.* **48**, 563-590.
- Salkowski (1872). Über die Bestimmung der Harnsäure. *Pflüger's Archiv f. ges. Physiol.*, **5**, 210.
- Schmidt u. Mühlheim (1883). Über stickstoffhaltige Körper in der Kuhmilch. *Pflüger's Archiv f. ges. Physiol.*, **30**, 379.
- Schittenhelm u. Wiener (1909). Über das Vorkommen und die Deutung von Allantoin im menschlichen Harn. *Zeits. f. physiol. Chem.*, **63**, 283.

- Tawara u. andere viele Autoren (1886-1909). Mitteilungen aus dem Hygienischen Institut zu Tokyo, **10**.
- Thanhäuser u. Durchmüller (1918). Experimentelle Studien über den Nukleinstoffwechsel. V. Mitteilung. Über die Aufspaltung des Purinrings durch die menschlichen Darmflora. Zeits. f. phys. Chem., **102**, 148.
- Van Slyke u. Cullen (1914). A permanent preparation of urease and its use in determination of urea. Jour. of Biol. Chem., **19**, 211.
- Vozarik (1906). Zur Methodik der Harnazidimetrie. Pflüger's Archiv f. ges. Physiol., **111**, 473.
- Weintraud (1902). Verhandlungen des Congress. f. innere Medizin, **10**, 153.
- Wiechowski (1906-7). Die Produkte der fermentativen Harnsäurezersetzung durch tierische Organe. Hofmeister's Beiträge, **9**, 295.
- Wiechowski (1908). Die Bedeutung des Allantoins im Harnsäurestoffwechsel. Hofmeister's Beiträge, **11**, 109.
- Wiechowski (1913). Die Purinstoffe und das Allantoin. Neubauer-Huppert Analyse des Harns. **11**, 920.

Diagramm I.



—— Ausgesch. Harn-P-K-N

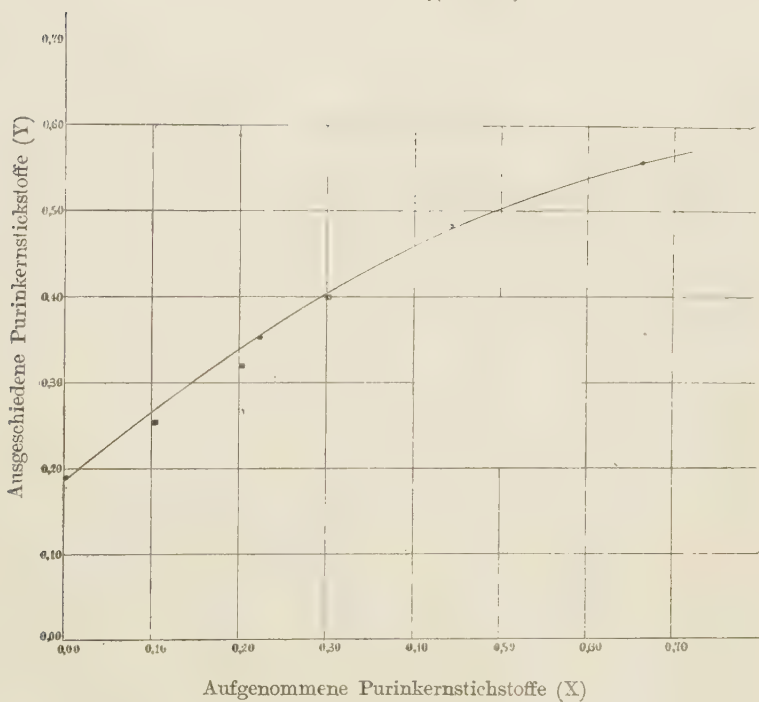
--- Aufgenommene P-K-N

..... Ausgesch-Kot, P-K-N

Diagramm II.

Physiologisches Verhältnis zwischen
den
aufgen. u. ausgesch. Purinkernstickstoffen (X)

$$Y = (0,18 + 0,99X)(1 - 0,5X)$$

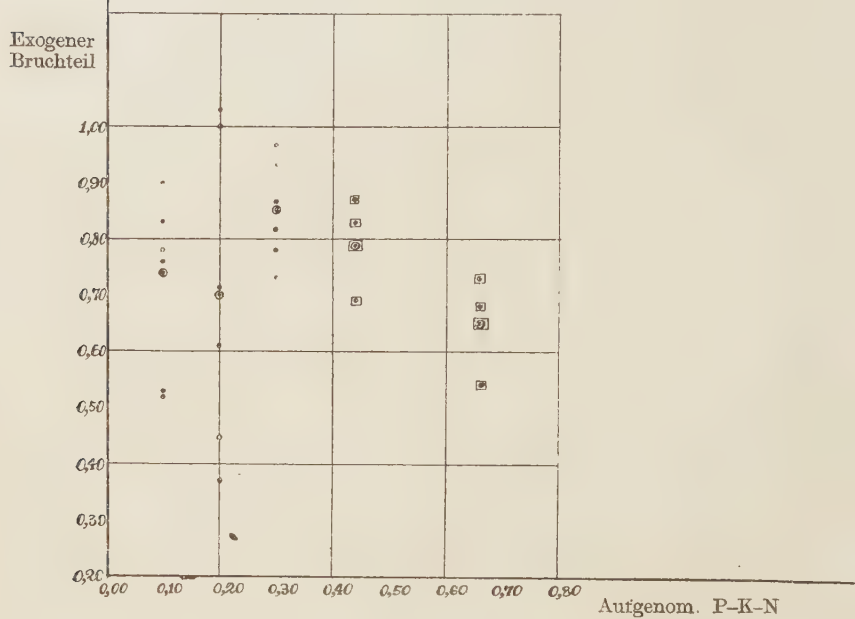


• Aminopurin

■ Oxyipurin

Diagramm III.

Graphische Darstellung des exogenen Bruchteils



- Tägliche Data
- ⊙ Durchschnittszahl
- Aminopurine
- Übrige Oxypurine

STUDIES IN THE GASTRIC JUICE.

III. On the empty stomach juice, the secretion at the time when the stomach is empty.*

By

MAKI TAKATA.

(From the Biochemical laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tohoku
Imperial University, Sendai. Director : Prof. Katsuji Inouye.)

(Received for publication, December 8, 1921.)

Even when no food is present in the stomach, a small quantity of fluid is discharged from the Pavlov's small stomach. Various names have been employed by different authors to designate this fluid or its combination with the ordinary gastric juice; for instance, "continued secretion," (Carlson, 1915 i) "hunger juice," (Carlson, 1915 ii) or "fasting juice" (Hull and Keeton i 1917). But the use of the term empty-stomach juice which indicates the nature of this juice most appropriately, seems to be preferable to the others. So far as I am aware, this juice has not yet been the subject of systematic examination. In this paper I shall therefore present the results of a series of observations on the enzymes in this fluid.

The *rate of flow* is very slow; it is in general 1-1.5 cc. per hour from a small stomach of the moderate size, which is not older than one year.

This secretion is a thick, viscid mucous fluid, and contains mucin flakes in such abundance at times that the whole will make a solid mass.

The *reaction* is neutral or faintly acid in most cases. But, there are many factors by which the reaction may be controlled. In the first place, the amount of mucin comes into consideration. Usually, the smaller the amount of mucin, the higher is the

* The first two of these studies, the relation of lack of chlorides in the animal body to hydrochloric acid of the gastric juice, and the action and properties of the gastric of the gastric lipase, appeared in the Tohoku Journal of Experimental Medicine Vol. I, P. 354, and II, P. 209.

acidity. Also the race and the character of the dog have an effect upon the reaction. Some ten of seventeen dogs, which have been hitherto observed by the author, as a rule, gave the neutral secretion, while others produced always the acid one. The secretion of a tame and sensitive animal is more acid than that of a stupid and dull-nerved one. Besides, the time after operation, too, perhaps has a relation to the reaction. The highest acidity which I could hitherto observe was 0.2 per cent HCl. An alkaline reaction was not once observed, the juice with a high acidity is perhaps contaminated by gastric juice in the ordinary sense.

The *specific gravity* of the secretion varies between 1.006 and 1.007.

The *dry residue* is on the average 1.4873 gm. per 100 cc. of which 0.9838 gm. is the organic matter and 0.5035 gm. the ash.

ENZYMES OF THE SECRETION.

Pepsin.

The high concentration of pepsin in this secretion was pointed out by Carlson (1915 i) and Keeton and Koch (1915). The following experiments carried out by the colorimetric method devised by the author (1921) have confirmed their observations.

1 cc. of the secretion of a dog was diluted by the addition of 10 cc. of 0.5 per cent hydrochloric acid. Simultaneously, 1 cc. of ordinary gastric juice of the same dog, taken one hour after feeding, was treated in the same manner. 1 gm. of fuchsine fibrin was put into each of them and placed in an incubator. After a given time, the colour of the digestion mixtures was compared by means of the colorimeter of Duboseq. The results obtained are summarized in Table I.

TABLE I.

No. of cases.	Time of incubation in minutes.	Proportion of peptic activity. Empty juice : Ordinary juice.
I	50	1.6:1
II	30	0.9:1
III	30	1.1:1

Pepsinogen.

Subsequently, experiments were made to determine whether active pepsin or its zymogen is contained in the empty stomach juice. Portions of 2 cc. each of empty juice were mixed with 2 cc. of one per cent sodium carbonate and allowed to stand at room temperature for different periods. After the lapse of the given time, the contents of the flasks were made acid by delivering 10 cc. of 0.1 *N* HCl into each of them. Then, their peptic activity was determined and compared colorimetrically, using 2 cc. of the same empty juice, diluted with 2 cc. of Ringer's solution and 10 cc. of 0.1 *N* HCl, as standard. Time of digestion was 3 hours.

TABLE II.

No. of the flask.	Time of exposure to alkali in minutes.	Peptic activity.
1	0	1
2	5	0.69
3	15	0.54
4	60	0.37

In the following experiment, all with pepsinogen present were first activated by hydrochloric acid and then exposed to the action of alkali. For the purpose, 2 cc. of empty juice and 2 cc. of 0.1 *N* HCl were transferred into each of two small Erlenmeyer flasks, shaken and allowed to stand over night. 5 cc. of one per cent sodium carbonate were then poured into one of the flasks and well mixed. After standing at room temperature for 30 minutes 15 cc. of 0.1 *N* HCl were put into this flask. Into the other was poured a mixture of 15 cc. of 0.1 *N* HCl and 5 cc. of one per cent sodium carbonate. After that 0.5 gm. of fuchsine fibrin was put into each of the mixtures and placed in a thermostat for an hour. Whilst an intensive digestion took place in the control test, the digestion mixture with the empty juice previously exposed to the action of alkali, remained perfectly colourless.

From the results of the above experiments it is evident that

the pepsin of the empty juice is secreted, at least in part, in the form of zymogen; a fact demonstrating the actual secretion of pepsinogen.

Rennet.

The empty juice shows a marked clotting action on milk.

Lipase.

The existence of a powerful fat-splitting enzyme in the empty juice has been demonstrated by the works of Hull and Keeton (1917) and of the author (1921).

Nuclease.

Most authors (Popoff, 1894; Umber, 1901; Abderhalden and Schittenhelm, 1906; London and Schittenhelm 1907; Levene and Medigreceanu, 1911) will not recognize any hydrolysing action of gastric juice upon nucleic acid, although Milroy (1896) reported that, in his experiment, phosphoric acid was liberated from nucleins by the action of pepsin. Mitra (1912), too, believes to have detected a nuclease in the stomach of the child older than one and half months.

Since the nuclease is in general very sensitive to the presence of acids, it is possible that the failures of the earlier investigations is due to the destruction of the enzyme by the hydrochloric acid. This was clearly shown in the following set of experiments that the neutral empty stomach juice exerts a fairly strong action upon nucleic acid. The gastric juice collected after feeding however will not show any definite action.

To a certain amount of about 2 per cent watery solution of sodium salt of yeast nucleic acid (E. Merck), which was purified by repeatedly dissolving in water and precipitating with alcohol until no more free phosphoric acid could be detected in the solution, and decolorized by means of animal charcoal, a measured amount of empty juice and a little of toluene were added, and well

mixed. Immediately after mixing, an adequate portion was drawn from the mixture, filtered and examined by the aid of a polarimeter. The remaining part of the mixture was placed in a water bath warmed at 37° . After a given time had elapsed, a portion was drawn for the second time, filtered and subjected to the polarimetric examination. Change of the rotatory power produced during the digestion indicates the degree of hydrolysis. The optical activity was determined in a 1 dm. tube with white light. It may be mentioned that, when the empty stomach juice alone was incubated, no appreciable change of rotation occurred.

TABLE III.

No. of the flask.	Amount of sodium nucleinate.	Amount of empty stomach juice.	Water	Rotation observed		Remarks.
	cc.	cc.		before digestion.	after digestion	
Dog A. Reaction of the juice was nearly neutral. Time of digestion was 12 hours.						
1	40	5	5	+1.03°	+0.60°	
2	10	+1.04°	+0.98°	
Dog A. Reaction of the empty stomach juice was neutral. Time of digestion was 6 hours.						
1	20	1.5	3.5	+1.43°	+1.22°	
2	5	+1.43°	+1.43°	
Dog B. Reaction of the empty stomach juice was neutral. Time of digestion was 15 hours.						
1	20	0.5	4.5	+1.01°	+0.74°	
2	5	+1.02°	+0.98°	
Dog A. Ordinary acid gastric juice after feeding which was neutralized before use. Time of digestion was 48 hours.						
1	30	10	+2.56°	+2.48°	Sodium nucleinate was 4%.
2	10	+2.57°	+2.50°	

TABLE IV.

Dog B. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

Amount of sodium nucleinate. cc	Amount of empty stomach juice. cc.	Rotation after digestion for				
		0h	1h	2h	3h	4h
50	8	+1.60°	+1.22°	+1.20°	+1.16°	+1.15°

Subsequently, after a prolonged digestion of sodium nucleinate by empty juice, 60 cc. of the digestion mixture were pipetted out and diluted with water. The phosphoric acid set free was then determined by precipitating it with magnesia mixture.

TABLE V.

Dog C. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

No. of the flask.	Amount of sodium nucleinate.	Amount of empty stomach juice diluted five times with Ringer's solution.	Water.	Rotation after digestion for				Mg ₂ P ₂ O ₇ found in 60 cc. of the mixture after 72 hours' digestion.
				0h	24h	48h	72h	
1	140(2.%) ^{cc}	40 ^{cc.}	...	+1.38°	+0.96°	+0.96°	+0.89°	0.0103 ^{gm.}
2	"	40	+1.41°	+1.33°	+1.33°	+1.33°	0.0012
3	40	140	-0.02°	-0.02°	-0.02°	-0.02°	0.0009

Dog B. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

1	120(4%)	30	+2.67°	+1.22°	+1.11°	+0.81°	0.0350
2	"	30	+2.68°	+2.61°	+2.61°	+2.59°	0.0031

TABLE VI.

Dog A. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

5 cc. of 10 per cent sodium nucleinate, prepared from the mucous membrane of ox intestine, 3 cc. of empty stomach juice and 1 cc. of toluene were well mixed at 45°. The mixture was kept at 38° for 24 hours. The mixture was then cooled by the aid of running water, and its consistency was noticed.

No. of test.	Consistency of the contents of the flasks after 24 hours' digestion.	Remarks.
1	Fluid.	
2	"	
3	Solid, gelatinous	Boiled empty stomach juice was used.
4	" "	"

From the above tables it is obvious that the empty juice contains an enzyme splitting up nucleic acid. But this enzyme, like the gastric lipase, would be easily destroyed by the action of the hydrochloric acid secreted after feeding. It is therefore impossible to detect it in the gastric juice obtained in the ordinary way.

Amylase.

On the basis of numerous experiments Ellenbeger and his pupils have stated that the pig's stomach produces an amylase. With regard to the other mammals the problem must not be considered as settled. Because of this, the following set of experiments was undertaken. In these experiments, the empty juice, undiluted or diluted with Ringer's solution, was allowed to act under various conditions upon soluble starch (Kahlbaum) with toluene as an antiseptic, and its amylolytic activity was determined by the iodine and the reduction test, and by changes in the rotation of the digestion mixture. It was found that the empty juice has a weak amylolytic action. Its strength is very feeble; it is about one-hundredth that of the saliva of normal persons. Some of the data collected in these experiments are shown in the following tables.

It is to be noted that proteins interfere with the results of iodine test, as may be seen from table VII. I have always performed the iodine test on account of this after the removal of mucin.

TABLE VII

Experiments relating to the effect of mucin on the iodine test.

Dog D.

	Iodine test
1 cc. of the juice was incubated for 10 minutes without addition of starch and then 2 cc. of 0.1% starch solution were added.	Violet
1 cc. of the juice was incubated for 10 minutes without addition of starch and then 2 cc. of 0.1% starch solution were added.	Violet-blue
As the above, except that empty stomach juice was incubated for 60 minutes.	Violet
1 cc. of the juice and 2 cc. of 0.1% starch solution were mixed and incubated for 10 minutes, then the mucin flocks were removed by diluted HCl, and the iodine test was performed.	Yellow
1 cc. of the juice was incubated for 10 minutes without addition of starch, then the mucin flocks were removed by diluted HCl; 2 cc. of starch were added to the filtrate.	Blue
As the above, except that the time of incubation was 60 minutes.	Blue
Similar test with the boiled juice.	Blue
Similar test with the boiled juice.	Violet-blue
1 cc. of the juice was incubated for 15 minutes with 2 cc. of 0.1% starch solution, and then mucin was removed by diluted HCl.	Violet-red

TABLE VIII.

Dog A.

No. of test.	Empty stomach juice, twice diluted. cc.	Starch. 0.1% cc.	Time of incubation at 38° (minutes).	Iodine test.
1	1	5	0	Blue
2	"	"	10	Violet
3	"	"	20	Yellow
4	"	"	30	Yellow
5	"	"	40	Yellow
6	"	"	80	Yellow

Dog B.

No. of test.	Empty stomach juice, twice diluted. cc.	Starch. 0.1% cc.	Time of incubation at 38° (minutes).	Iodine test.
7	1	2	5	Red
8	"	"	10	Yellow
9	"	"	15	Yellow
10	"	"	20	Yellow
11	" (boiled)	"	15	Blue
12	"	4	13	Red
13	"	"	18	Yellow

TABLE IX.

Dog C.

Effect of acid and alkali.

No. of test.	Empty stomach juice, 3 times diluted. cc.	Starch. 0.1% cc.	0.1 n HCl. cc.	0.1 n NaOH. cc.	Reaction of the digestion mixture.	Time of incubation at 38° (min.)	Iodine test.
1	1	2	—	0.25	Alkaline	10	Blue
2	"	"	—	"	"	40	Violet
3	"	"	—	—	Neutral	5	Violet
4	"	"	—	—	"	10	Violet-red
5	"	"	—	—	"	20	Red
6	"	"	3 drops	—	Acid	10	Blue
7	"	"	"	—	"	20	Violet-Blue
8	"	"	0.25	—	"	30	Blue
9	"	"	"	—	"	60	Blue

TABLE X.

Dog E. The empty stomach juice was diluted with a mixture of 10 cc. of 1/3 m NaH_2PO_4 , 10 cc. of 1/3 m Na_2HPO_4 , 5 cc. of 1% NaCl , and 73 cc. of water.

No. of test.	Empty stomach juice, 10 times diluted. cc.	Starch 0.1%. cc.	Time of incubation at 38° (minutes).	Iodine test.	Reduction test.	Remarks.
1	2	2	120	Red	Positive	
2	"	—	"	Blue	Negative	After incubation 2 cc. of starch solution were added.
3, a 3, b	" (boiled)	— 3	" "	Blue	Negative	
4	2	2	120	Red	Positive	After incubation the contents of both test-tubes were mixed together.
5	"	—	"	Blue	Negative	After incubation 2 cc. of starch solution were added.
6, a 6, b	" (boiled)	— 3	" "	Blue	Negative	After incubation the contents of both test-tubes were mixed together.

TABLE XI.

Dog F.

No. of test.	Empty stomach juice, 3 times diluted. cc.	Starch 0.5%. cc.	Time of incubation at 38° (hours).	Iodine test.	Reduction test.	Remarks.
1	2	2	10	Yellow	Strong positive	
2	"	"	15	Yellow	Strong positive	
3	"	—	15	Blue	Negative	After incubation 2 cc. of starch solution were added.
4, a 4, b	" " (boiled)	3	15 15	Blue	Negative	

TABLE XII.

Dog B. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

Empty stomach juice. cc.	Starch 2%. cc.	Rotation after digestion for		
		0 ^h	1 ^h	2 ^h
5	50	+3.10°	+2.90°	+2.82°

Maltase.

The determination of this enzyme was carried out in the following manner. A certain amount of the empty stomach juice, diluted with Ringer's solution, was allowed to act on a known quantity of a solution of maltose (E. Merck) at 38° for a given times with toluene as an antiseptic. And the rotation of the digestion mixture was determined before and after incubation. The results obtained are given in the following tables.

TABLE XIII.

Dog A. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

No. of test.	Empty stomach juice 5 times diluted. cc.	Water. cc.	Maltose 2.5%. cc.	Rotation after digestion for		
				0 ^h	24 ^h	60 ^h
1	10	—	10	+1.68°	+1.59°	+1.49°
2	—	10	10	+1.68°	+1.68°	+1.68°

TABLE XIV.

Dog B. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

Time of digestion was 12 hours.

No. of test.	Empty stomach juice twice diluted. cc.	Water. cc.	Maltose. 2% cc.	Rotation	
				before diges- tion.	after diges- tion.
1	10	—	50	+1.88°	+1.48°
2	—	10	50	+1.93°	+1.93°

TABLE XV.

Dog B. Reaction of the empty stomach juice was neutral.

Empty stomach juice twice diluted. cc.	Maltose 2%. cc.	Rotation after digestion for		
		0h	1h	6h
15	50	+1.68°	+1.60°	+1.44°

The above results allow of the conclusion that the empty stomach juice slightly but distinctly hydrolyses maltose.

Sucrase.

This enzyme could not be detected in the empty stomach juice.

MUCUS.

On the formation and the secretion of mucus in the stomach we find a great number of communications in literature, made particularly from the standpoint of the clinical interest.

Kaaback and Rosenstein (1908) for example counted 85 of them, Nevertheless, only a little is known with certainty regarding the biochemical aspect of the subject.

Method of determining the mucus.

The most reliable method for the determination of mucus is apparently that of Pewsner (1907) which consists in collecting mucus on a filter, and weighing it after desiccation. By this method, however, only the mucin flocks can be determined.

It is conceivable that the amount of mucus may be ascertained by determining the amount of its characteristic constituent, split up under certain suitable conditions.

The first chemical study of the gastric mucin is due to López-Suárez (1913). He has studied in the laboratory of Hofmeister the mucin of the pig's stomach and found a conjugated sulphuric

acid and purin bases among the decomposition products. So he concluded that it might be a mixture of chondroproteid, nucleoproteid and some other proteins. The same author and Levene (1916 i, ii, 1918) investigated thereafter the constitution of the conjugated sulphuric acid, and gave it the name mucoitin sulphuric acid.

Since the mucoitin sulphuric acid is an essential constituent of gastric mucus, my attention was first directed to the carbohydrate for the purpose of determining the mucus. In the endeavour to find conditions of hydrolysis under which a fixed quantity of sugar could always be obtained from a given amount of mucus, the mucus of the pig's stomach was treated by hydrochloric acid in different degrees of concentrations and in different lengths of heating. It was found that the following procedure would give a constant result with a maximum reducing power. The same was found also in the experiments conducted on the submaxillaris mucin of dog.

About 1 gm. of mucus is heated under reflux condenser with 40 cc. of 10 per cent hydrochloric acid on a water-bath. After 5 hours' boiling the reaction product is neutralized with sodium hydroxide and its reducing power is determined by the Bertrand's method. In the following experiments the mucus content was determined by this method.

The cavity of the small stomach was washed out by 500 cc. of Ringer's solution, and five hours after that it was washed for the second time. The empty stomach juice secreted in five hours and the second wash water were combined, concentrated under diminished pressure and the content of mucus was determined. At the same time, the nitrogen content was determined by Kjeldahl. Then the dog was fed, and the gastric juice was again collected in five hours. At the end of the fifth hour, the cavity was washed again. The gastric juice and the wash water were combined, neutralized, concentrated and submitted to the estimation of mucus. The results of the determinations are summarized in Table XVI. The amount of mucus is stated in cc. of permanganate solution used for titration.

TABLE XVI.

No. of experiment.	Juice.	Total amount of juice secreted in five hours. cc.	Total amount of mucus secreted in five hours.	Total nitrogen secreted in five hours. mg.
1	Before feeding	5	2.1	12.6
	After "	52	1.6	29.0
2	Before "	4	1.4	8.4
	After "	48	1.4	24.0
3	Before "	4	1.2	
	After "	40	1.3	

From the above results it is plain that the secretion of mucus would not be influenced by feeding contrary to the statement of Schütz (1909) and Aldor (1909).

Now in order to study any possible effect of acid on the mucus secretion, 10 cc. of 0.5 per cent hydrochloric acid were introduced to the small stomach and allowed to stay there five hours. No change in the mucus content of juice could be ascertained.

SUMMARY.

1. Physical properties of the secretion coming from the empty stomach, for which the name empty stomach juice was proposed, and the enzymes present in it were studied.

2. The empty juice contains pepsin resp pepsinogen, rennet, lipase, nuclease, amylase and maltase.

3. A method of determining the amount of mucus in gastric juice was described.

4. The amount of mucus secreted in an unit time is not at all influenced by feeding.

5. The amount of mucus does not seem to be affected by the presence of 0.5 per cent hydrochloric acid.

REFERENCES.

- Abderhalden, E. and Schittenhelm, A. (1906): Zeitschr. f. physiol. Chem., 47, 452.

- Aldor, L. V. (1909): Berl. Klin. Woch., 826, 882.
Bópez-Suárez, J. (1913): Biochem. Zeitschr., **56**, 167.
Carlson, A. J. (1915): Am. Jl. of Physiol., **37**, 50.
Carlson, A. J. (1915): Am. Jl. of Physiol., **38**, 248.
Hull, M. and Keeton, R. W. (1917): Jl. of Biol. Chem., **32**, 127.
Kaaback, M. and Rosenstein, A. (1908): Virchow's Arch., **194**, 515.
Keeton, R. W. and Koch, F. C. (1915): Am. Jl. of physiol., **37**, 481.
Levene, P. A. and López-Suárez, J. (1916, i): Jl. of Biol. Chem., **25**, 511.
" " (1916, ii): " **26**, 373.
" " (1918): " **36**, 105.
Levene P. A. Medigreceanu, F. (1911): Jl. of Biol. Chem., **9**, 375.
London E. S. and Schittenhelm, A. (1907): Zeitschr. f. physiol. Chem., **70**, 10.
Milroy, T. H. (1896): Zeitschr. f. physiol. Chem., **22**, 307.
Mitra, M. (1912): Biochem. Centralbl., **13**, 534.
Pewsner, M. (1907): Berl. klin. Woch., **44**, 41.
Popoff, P. M. (1894): Zeitschr. f. physiol. Chem., **18**, 533.
Umber, F. (1901): Zeitschr. f. Klin. Med., **43** 282.
Schütz, E. (1909): Berl. Klin. Woch., 1253.
Takata, M. (1921): Tohoku Jl. Exp. Med. **2** 127.
Takata, M. (1921): Tohoku Journal. Exp. Med. **2** 209.

FURTHER STUDIES OF THE NATURE OF NITRIFICATION.

By

KOJI MIYAKE and S. SŌMA.

(From the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo.)

(Received for publication, December 30, 1921.)

It has been demonstrated by one of the authors that the processes of ammonification and nitrification are auto-catalytic mono-molecular chemical reactions and that the increase of ammonia and nitric acid in these processes is in accordance with the formula

$$\log x - \log (A - x) = K (t - t_1)$$

$$\text{or } \log x - \log (A - x) = Kt - K_1$$

where x is the amount of nitrogen in the form of ammonia and of nitric acid which has been produced at the time t , A is the total amount of nitrogen in the form of ammonia and of nitric acid produced during the process, K is a constant and K_1 is also a constant, and t_1 is the time in which half of the total amount of nitrogen in the form of ammonia and of nitric acid is produced.

This proof has been secured by the application of the autocatalytic chemical equation to the results of Lipman's, Lemmermann's and Warrington's experiments, and the results of further studies of ammonification were also reported by one of the authors.

In the case of nitrification, it became interesting to see what results would be brought out by our experiment. The present paper is concerned with the results of nitrification.

EXPERIMENTAL.

The soil employed in the present investigation was taken from the experimental field of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Japan. It was used for the experiment in an air-dried condition after having been passed through a 1 millimeter sieve. As chemical to be nitrified, sulphate of ammonia was used.

For this experiment ten grams of air-dried soils were employed and dilute ammonium sulphate solution equivalent to sixty per cent of water capacity of the soil, that is 3.2 cc. of the solution were distributed in it. This solution contains a quantity of ammonium sulphate equivalent to 0.01 milligram of nitrogen. The soil thus prepared was kept in 100 cc.-Erlenmeyer flasks stoppered with cork. After incubation at a constant temperature (30°C) for certain intervals of time as indicated in the tables below, nitrogen transformed in the form of nitric acid and ammonia nitrogen which was undergoing transformation were determined.

The content of the flask was transferred into a distilling flask with water, and ammonia nitrogen was determined by the usual distillation method with an excess of magnesium oxide. In the case of nitric acid the content of the flask was transferred into a measuring flask (250 cc. or 500 cc. according to concentration of nitric nitrogen) by means of a little water and well shaken. After standing for ten minutes it was filled up to the mark with distilled water and filtered. Ten cubic centimetres of this clear solution were taken and the amount of nitric nitrogen was determined calorimetrically by the use of phenoldisulphonic acid.

During the experiment the flasks were weighed from time to time and water was added to contain the amount necessary for a 60 % of the water capacity of the soil and the water content of the soil was held almost constant through the experiment.

The following results were found:—

TABLE I.
Milligrams of nitric nitrogen found and of that
calculated by the formula.

Equation for calculation: $\log x - \log (2.681 - X) = 0.08743t - 1.42552$.

Days	Nitric Nitrogen	
	Calculated	Found
1	0.117 <i>mg.</i>	0.097 <i>mg.</i>
3	0.172	0.138

Days	Nitric Nitrogen	
	Calculated	Found
5	0.249 <i>mg.</i>	0.216 <i>mg.</i>
7	0.357	0.333
8	0.424	0.417
10	0.588	0.600
11	0.685	0.831
13	0.910	1.001
15	1.165	1.201
19	1.695	1.647
21	1.930	1.816
24	2.211	2.287
26	2.347	2.287
29	2.480	2.516
32	2.571	2.516

It will be seen from the above table that in nearly every case the observed and calculated value agree well. Now, there is no doubt also that the nitrification process is an autocatalytic chemical reaction and that the increase of nitric acid in this process is in accordance with the formula.

$\log x - \log (A - x) = (t - t_1)$, as stated in the previous paper.

For the application of the equation of an auto-catalytic monomolecular reaction upon the diminution of ammonia nitrogen, the form of the equation will be written as follows

$$\log (A - x) - \log (x - a) = (A - a) Kt - K_1$$

where a and A respectively denote the final and original amount of ammonia, and x is the amount of nitrogen in the form of ammonia at the end of time t . K and K_1 are constant. The amount of ammonia nitrogen found and calculated will be seen in the following table.

TABLE II.
 Milligrams of ammonia nitrogen found and
 that calculated by formula.

Days	Ammonia nitrogen	
	Calculated (mg.)	Found (mg.)
1	10.733	10.809
4	10.676	10.671
5	10.639	10.602
6	10.587	10.568
7	10.524	10.499
8	10.451	10.286
10	10.265	10.237
12	10.026	9.879
13	9.888	9.845
15	9.581	9.501
17	9.257	9.294
19	8.942	9.019
21	8.652	8.881
24	8.349	8.262
26	8.199	8.193
29	8.053	7.986
32	7.971	7.780
35	7.927	7.918

These values are sufficiently close to favour the view that the reaction is an auto-catalytic mono-molecular chemical reaction.

The accompanying diagram of curves enables us to compare more easily.

SUMMARY.

1) We have confirmed again that the process of nitrification as a whole is an auto-catalytic mono-molecular chemical reaction and that the increase of nitric acid in the process is in accordance with the formula :

$$\log x - \log (A - x) = K(t - t_1)$$

2) The process of the diminution of ammonia compounds from the soil is a auto-catalytic chemical reaction. Decrease of ammonia nitrogen is expressed in the formula :

$$\frac{\log (A - x)}{\log (\bar{x} - a)} = (A - a) Kt - K_1,$$

where x is the amount of nitrogen in the form of ammonia at the end of time t , and A and a respectively denote the original and final amount of ammonia. K is a constant and K_1 is also constant.

REFERENCES

- Miyake K. (1916):— On the Nature of Ammonification and Nitrification. Soil Science, **2**, 481-492.
 Miyake K. (1917):— Further Studies of the Nature of Ammonification. Soil Science, **4**, 1917, 321-325.

Fig. 1.

Comparison of the amount of nitrogen found with
that Calculated by Formula.

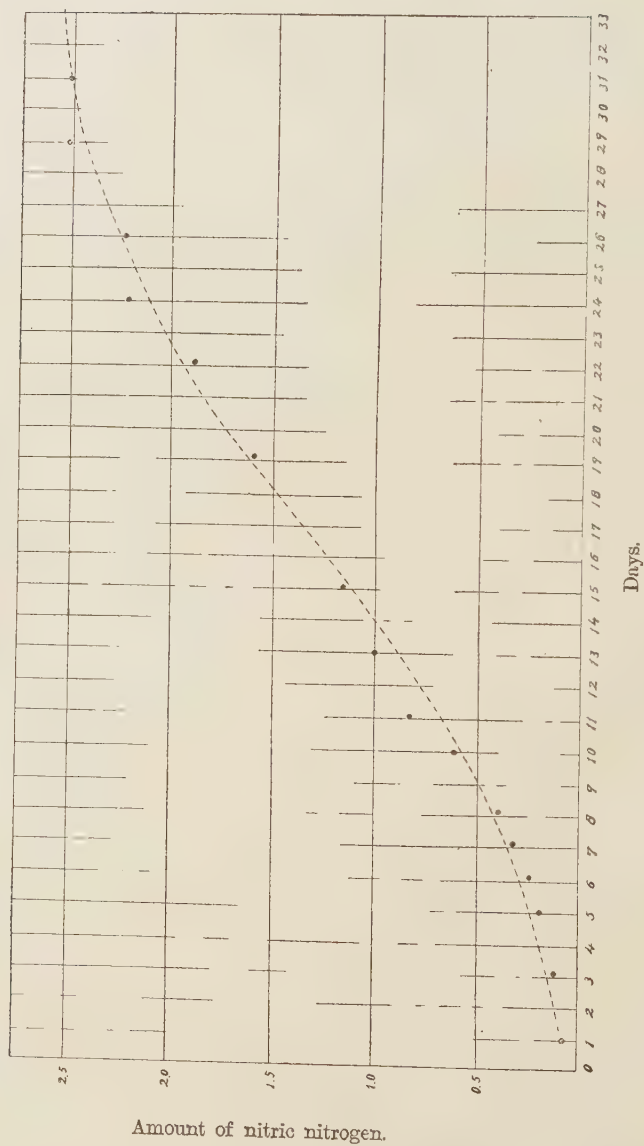
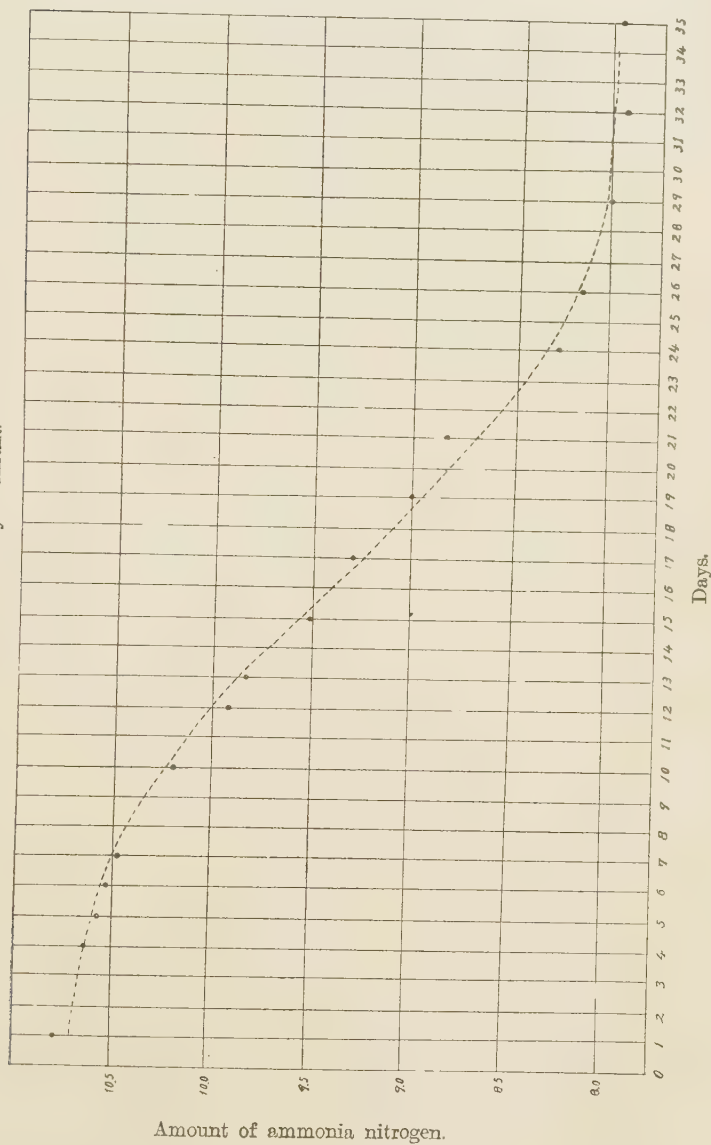


Fig. 2.

Comparison of the amount of ammonia nitrogen found with
that Calculated by Formula.



PRELIMINARY COMMUNICATION ON MANNANASE AND LAEVIDULINASE.

By

MINORU MAYEDA.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo
Imperial University, Tokyo. Director : Prof. Samuro Kakiuchi)

(Received for publication, December 30, 1921.)

SECTION I. INTRODUCTION.

The author (1911) had occasion to test the digestibility of konjak—a food extensively eaten by the Japanese people. This food is prepared from konjak-powder by adding a certain amount of water and heating the mixture in a pot containing calcined water. The author analysed konjak-powder and found its composition to be as follows :

protein	2.4%
fat	0.1,,
hydrolysable carbohydrate	68.2,,
ash	9.8,,

The main part of the hydrolysable carbohydrate (95%) consisted of a mannan which gave two molecules of mannose and one molecule of glucose. This was called "konjak-mannan" by the author (1915).

As a result of a digestive test, it was found that ninety five per cent of the food was digested and absorbed in the human intestine.

The presence of special enzyme for mannan in the mucous membrane and pancreas of the pig and horse was insisted upon by Sawamura (1902). But, Mr. and Mrs. Gatin (1905) and others could not prove its presence. The author examined this point and could not find any trace of such an enzyme in the

mucous membrane of the intestinal tract of mammalia, nor could he prove the formation of "Anpassungsenzyme" after a long period of konjak-ration (1920).

As pointed out by Bierry and Giaja (1906 and 1909) the hepato-pancreatic juice of *helix pomatia* and digestive fluid of *astacus fluviatilis*, *homarus vulgaris* and *maja squinads* have the power of hydrolysing the mannan into monosaccharids. The author (1920) observed also that the "konjak-mannan" was converted into the mixture of mannose and glucose by the action of digestive fluid of snail and water-snail. The digestive tract of the carp does not contain any trace of the enzyme effective on the "konjak-mannan."

Sawamura (1902-3) reported that the "konjak-mannan" is liquefied by *B. mesentericus vulgaris*. The author confirmed this statement and studied the process more thoroughly, the results of which will be outlined in the following pages.

SECTION II. THE ACTION OF SAPROPHYTIC BACTERIA AND FUNGI ON "KONJAK-MANNAN."

Pure culture of each of the following saprophytic bacteria was inoculated into the following culture-medium for 48 hours.

Culture-medium for bacteria,	
Pepton.	10 gm.
MgSO ₄	1 "
K ₂ HPO ₄	1 "
Konjak	40 "
Aq. dest.	1000 cc.

The mixture was made slightly alkaline with the addition of sodium carboate.

Out of 17 species of saprophytic bacteria tested, the following four species were found to cause the liquefaction of "konjak-mannan."

B. mesentericus vulgatus
B. mesentericus flavus
B. mesentericus fuscus
B. leptosporus

TABLE I.
 Action of various bacteria on Konjak-mannan.

Species of bacteria	Liquefaction of mannan.	Mannose from mannan.
<i>Micrococcus candicans</i>	—	—
„ <i>urea</i>	—	—
<i>Sarcina albida</i>	—	—
„ <i>aurantiaca</i>	—	—
<i>B. mesentericus fuscus</i>	+++	—
„ „ <i>flavus</i>	+++	—
„ „ <i>vulgatus</i>	+++	—
„ <i>leptosporus</i>	+++	—
„ <i>aureus</i> Wichmann	—	—
„ <i>subtilis</i>	—	—
„ <i>anthracoides</i>	—	—
„ <i>megat. bonebycis</i>	—	—
„ <i>mycoideus rosens</i>	—	—
„ <i>lactis niger</i>	—	—
„ <i>coli commune</i>	—	—
„ <i>pyocyaneus</i>	—	—
„ <i>fluorescens longus</i>	—	—

The liquefied mixture does not contain even a trace of mannose so that the split-product of mannan here represents an intermediate one.

The author succeeded in isolating the trisaccharid from this liquefaction-product. The substance is a white powder. Its watery solution is optically active and has $[\alpha]_D = -11.55$. It reduces the alkaline copper-solution but is not fermented by yeast. On hydrolysis with mineral acid it decomposes into molecules of mannose and one molecule of glucose. The constitution of this trisaccharid, which was named "Laevidulin" by the author, is now in the process of research.

For the experiments with the fungi, the three following culture-mediums were used.

Culture-medium A.		Culture-medium B.		Culture-medium C.	
Konjak	40 gm.	Laevidulin	100 gm.	Konjak	4 gm.
Soja-sauce	5 cc.	(or Konjak	40 „)	(or Laev.	10 „)
Onion-extract	10 „	Asparagin	2.5 „	Cane-sugar	50 „
Aq. dest.	1000 „	KNO ₂	2.0 „	Pepton	10 „
		MgSO ₄	0.5 „	KNO ₂	2 „
		CaCl ₂	0.1 „	K ₂ HPO ₄	1 „
		K ₂ HPO ₄	1. „	MgSO ₄	0.5 „
		Aq. dest.	1000 cc.	CaCl ₂	0.1 „
				Aq. dest.	1000 cc.

The mixture was made slightly acidic with the addition of acetic acid and inoculated with various fungi.

Out of fifteen species tested nine have the power of liquefying mannan. The most of them are not effective for mannose-production, while their grounded body-detritus shows more or less marked evidence of laevidulin-hydrolysis.

TABLE II.

Action of various fungi on Konjak-mannan and Laevidulin.

Species of fungi	Substrate and Culture-medium	Culture		Grounded bodies		Substrate and Culture-medium	Culture		Grounded bodies
		Liquefaction	Mannose-formation	Liquefaction	Mannose-formation		Liquefaction	Mannose-formation	
<i>Aspergillus niger</i>	A(k)	###	—	###	###	B(l)	+	###	
„ <i>oryzae</i>	„	††	—	††	±	„	—	+	
„ <i>glaucus</i>	B(k)	—		—	—	C(l)	—	—	
„ <i>candicus</i>	A(k)	###	—	###	—	B(l)	—	±	
„ <i>minimus</i>	B(k)	—		—	—	„	—	±	
„ <i>clavatus</i>	„	###	—	###	—	„	—	±	
„ <i>fumigatus</i>	A(k)	###	—	###	+	B(l)	—	††	
„ <i>albus</i>	B(k)	###	—	###	††	C(l)	—	††	
„ <i>ochraceus</i>	„	###	—	###	+	„	—	††	
„ <i>Wintii</i>	„	###	—	###	+	B(l)	—	††	
<i>Penicillium glaucum</i>	A(k)	###	—	###	††	„	—	††	
<i>Verticillium</i> „	„	±		—	—	„	—	—	
<i>Monilia candida</i>	„	—		—	—	„	—	—	
„ <i>japonica</i>	„	—		—	—	„	—	—	
<i>Charla mycoderma</i>	„	—		—	—	„	—	—	

This capacity is especially distinct in the case of *aspergillus niger* and *albus*, whereas it is less so in regard to other species.

From these experiments we can recognize sufficient evidence that there are two distinct enzymes for the hydrolysis of mannan into monosaccharides: the one is the enzyme for lævidulin-production from mannan; the other is the enzyme for hydrolysis of "lævidulin" into monosaccharides.

The author examined also the action of various diastatic preparations and found that both "digestin" and "enddiastase" have hydrolytic action on lævidulin while most preparations of animal origin do not show such an effect.

SECTION III. PROPERTIES OF MANNAN-HYDROCRASTIC ENZYMES.

To study the properties of mannan-hydrocrastic enzymes the action of both the extract of culture of *B. Mesentericus vulgatus* and the solution of digestin on either "konjak-mannan" or "lævidulin" was examined. The action of the enzymes was determined by the principle of Wohlgemuth and the limes of mannan-liquefaction was a chosen point where the solution showed no turbidity upon addition of equal volumes of 95 per cent alcohol, while the limes of mannose-formation represent the point, where there was no trace of mannohydrazon to be perceived.

Acid, alkali and salt. Both kinds of enzymes act most effectively at the neutral reaction, and their action weakens with the increase of either acid or alkali. Salts-content seems to be indifferent on the whole.

Temperature. The optimum temperature for the liquefying enzyme lies at 50°C, and that for mannose-formation at about 30°C, Dead temperature for the first is 70°C, while the second loses its activity at 60°C.

Dialysability. The solution made of digestin was put into a collodion capsule and dialysed against distilled water for 48 hours.

The dialysat and dialysant were separately tested in their activities. The results show that the liquefying action of the

dialysant decreased to 60% of the original effectiveness, while the activity of the mannose-formation was maintained up to the 90% after the dialysis. We can see, therefore, from these results that the liquefying enzyme and the mannose-forming enzyme have different diffusibilities.

SECTION IV. CONCLUSION.

From the foregoing experiments we can recognize the following facts :

1) Some of the saprophytic bacteria liquefy the "konjak-mannan" and form "lævidulin." The hydrolysis does not, however, proceed and there is no formation of mannose.

2) Some species of fungi, as *aspergillus niger*, liquefies mannan by means of its exoenzyme. The hydrolysis of "Lævidulin" into the mixture of mannose and glucose is only effected by endoenzyme which can be liberated from fungi after destruction of their cells.

3) The optimum temperature for liquefying and mannose-forming processes differ from each other, the former lying at about 50°C and the latter at 30°C.

4) Diffusibility of both kinds of enzyme differ a great deal.

These facts point out very clearly that the enzyme which liquefies the "konjak-mannan" is entirely different from that which forms mannose from "Lævidulin."

We propose to retain the name "Mannanase" for the former enzyme and to call the latter, "Lævidulinase."

REFERENCES.

- Bierry et Giaja (1906): Sur la digestion des mannanes et des galactanes. Comptes Rendus de la Societe de Biologie, **60**, 945.
Bierry et Giaja (1909): Digestin des mannanes et des galactances. Comptes Rendus de la Societe de Biologie, **148**, 735 et 507.
Gatin Mr. and Mrs. (1905): Über die Verdaulichkeit der Mannanen durch Diastasen der höheren Tiere. Comptes Rendus de la Societe de Biologie, **58**, 847.

Mayeda (1911): Über die physiologischen Untersuchungen des Konjak-Mannans.

I. Mitteilung. Mitteilungen der medicinischen Gesellschaft zu Tokyo. 25.

Mayeda (1915): " " " III. Mitteilung " " " , 29.

" (1920a): " " " V. " " " " , 34.

" (1920b): " " " VII. " " " " " "

Sawamura (1902): On the digestive power of the intestinal canal. Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University, 5, 155.

" (1903): On the liquefaction of mannan by microbes. *ibid.* 5, 280.

ÜBER DIE BESTIMMUNG DER ASSIMILATIONS- KRAFT DES MENSCHEN FÜR KOHLENHYDRAT.

VON

KÖZŌ SAKAGUCHI, OSAMU ASAKAWA und
TOSHITANE MATSUYAMA.

*(Aus der Medizinischen Klinik von Prof. Dr. Ryōichi Inada, Tokyo
Kaiserliche Universität, Tokyo.)*

(Eingegangen am 7. Dezember 1921.)

Bei verschiedenen Krankheiten kommt es gar nicht selten vor, dass man wissen will, ob eine Kohlenhydratstoffwechselstörung bei dem betreffenden Fall vorliegt. Zur Entscheidung dieser Frage hat man früher gewöhnlich 100 g Traubenzucker verabreicht. Wenn kein Zucker danach im Harn ausgeschieden wird, so schliesst man, dass die Zucker assimilierende Kraft hier normal ist, während man bei positivem Ausfall der Zuckerprobe eine Herabsetzung der Toleranz für Kohlenhydrat vermutet. Neuere Forschungen über die Zuckerausscheidungsschwelle haben aber den Glauben an die Brauchbarkeit dieser Methode von Grund aus erschüttert. Heutzutage steht es fest, dass die Glykosurie ausser von der Hyperglykämie auch von der Zuckerausscheidungsschwelle stark abhängt. Daher gilt es als selbstverständlich, dass es ganz falsch ist, aus dem Befunde der Glykosurie ohne weiteres einen Schluss auf die Kraft der Zuckerassimilation—welche eigentlich nach der Stärke der alimentären Hyperglykämie gemessen werden soll—zu ziehen, ohne den Schwellenwert dabei zugleich in Betracht zu ziehen. Obwohl zurzeit noch viele das Verhalten des Kohlenhydratstoffwechsels vorwiegend nach der alimentären Glykosurie beurteilen, muss man jetzt doch eine solche Untersuchungsmethode, bei wissenschaftlichen sowohl wie klinischen Untersuchungen, als ganz unzuverlässig entschieden zurückweisen. Dafür ist es nun dringend nötig, eine theoretisch richtige Methode zu ermitteln.

Viele Autoren (Hopkins, Hamman u. Hirschmann,

Williams u. Humphreys, Janney u. Isaacson, Maclean u. Wesselow) wollen die Stärke der Hyperglykämie, welche nach der Aufnahme einer verschiedenen Menge (zumeist 50 oder 100 g) Glukose zustandekommt, zur Bestimmung der Assimilationskraft für Kohlenhydrat heranziehen. Mag diese Methode theoretisch berechtigt sein, so stösst man doch bei praktischer Ausführung auf verschiedene Schwierigkeiten.

Der Kohlenhydratstoffwechselvorgang ist eigentlich von sehr labiler Natur und wird durch verschiedene Momente leicht beeinflusst. Infolgedessen erlaubt einmalige Untersuchung nicht immer—besonders dann nicht, wenn der Kohlenhydratstoffwechselvorgang nur leicht gestört ist—ein entscheidendes Urteil über die Assimilationskraft zu fällen. Hier ist wiederholte Untersuchung unbedingt nötig. Weil die Verabreichung einer grossen Dosis Zucker in den meisten Fällen Übelkeit und sogar oft Erbrechen verursacht, wird die Wiederholung der Untersuchung allerdings gewöhnlich von den Kranken mit grossem Widerwillen aufgenommen. Zunächst kommt der Umstand in Betracht, dass die Verabreichung einer grossen Menge Traubenzucker nicht ganz physiologisch normal ist. Die Assimilationskraft für Kohlenhydrat wird also sozusagen in einem abnormen Zustande bestimmt, wenn die Versuchspersonen dabei Übelkeit empfinden. Ausserdem hat die Zuckermethode noch den grossen Nachteil, dass die physiologische Variationsbreite der Hyperglykämie sehr gross ist und die Abgrenzung des Normalen vom Pathologischen dadurch erschwert wird. Nach Angaben von vielen Autoren (Frank, Jakobson, Hopkins, Graham, Hamman u. Hirschmann, Sakaguchi, Goto u. Kuno) erreicht der maximale Blutzuckergehalt nach 100 g beim Nichtdiabetiker 0,09 bis 0,23%. Auf Grund dieser Sachlage gehen die Ansichten der Autoren über die Frage, welcher Grad von Hyperglykämie als pathologisch anzusehen sei, natürlich auseinander. Nach Hamman und Hirschmann soll die Hyperglykämie bei Verabreichung von 100 g Traubenzucker in normalen Fällen unter 0,15% bleiben, während Grünthal 0,2% als Grenze des Normalen betrachtet. Nach 50 g. Glukose soll der Blutzucker beim Stoffwechselgesunden

nach Salomon in einer Stunde unterhalb des Wertes von 0,15% bleiben, während Hahn und Offenbacher die Blutzuckerzunahme, die 100% des Nüchternwertes nicht überschreitet, noch nicht als pathologisch betrachten wollen. Endlich sei hier noch erwähnt, dass die Intensität der Hyperglykämie nach Zuckeraufnahme auch bei demselben Menschen bei wiederholten Untersuchungen oft ziemlich grosse Schwankungen zeigt.

Um diese Nachteile zu umgehen, hat Sakaguchi schon lange bei der Bestimmung der Assimilationskraft des Kranken für Kohlenhydrat statt der gebräuchlichen Zuckermethode eine Probekost, welche aus 100 g Reis (lufttrocken gewogen, dann gekocht) und 1–2 Hühnereiern mit oder ohne Zugabe einer geringen Menge (ca. 20 g) Gemüse besteht, verabreicht und die dadurch verursachte Blutzuckeränderung zum Mass der Assimilationskraft des betreffenden Menschen genommen. Dabei wurde der Blutzuckergehalt halbstündlich zwei Stunden lang untersucht.

Aus zahlreichen Untersuchungen, welche im Laufe mehrerer Jahre in unserer Klinik ausgeführt wurden, schliessen wir, dass die Assimilationskraft gegen Kohlenhydrat für normal gehalten werden kann, wenn die Hyperglykämie nach unserer Probekost unterhalb 0,14% liegt und nach 1 bis 1½ Stunden vorübergeht. Wenn die alimentäre Hyperglykämie dagegen über 0,15% ansteigt oder über zwei Stunden andauert, kann man eine Störung der Assimilationsfähigkeit annehmen. Es scheint uns überflüssig, besonders hervorzuheben, dass man bei der Beurteilung der Untersuchungsergebnisse nicht nur die Stärke der Hyperglykämie sondern auch stets ihre Dauer in Betracht ziehen muss.

Unsere Methode übertrifft in verschiedenen Punkten bei weitem die gebräuchliche Zuckermethode. Erstens wird die Untersuchung bei unserem Verfahren unter ganz gleichen Bedingungen wie bei normaler Lebensweise ausgeführt, weil unsere Probekost eine physiologisch ganz richtige Nahrung darstellt. Zweitens kann man hier die Untersuchung ganz ruhig nach Bedarf wiederholen, weil die Kost den Versuchspersonen kein unangenehmes Gefühl verursacht. Drittens ist die physiologische Variationsbreite der

alimentären Hyperglykämie bei unserem Verfahren (unter 0,14%) weit kleiner als bei der Zuckermethode (0,09 bis über 0,20%), was die Abgrenzung des Normalen vom Pathologischen sehr erleichtert. Viertens schwankt das Untersuchungsergebnis an demselben Menschen bei unserer Kost weniger als bei Zuckerzufuhr. Wer mit der Zuckermethode viel gearbeitet hat, sollte gefunden haben, dass dabei die Intensität der Hyperglykämie bei wiederholten Untersuchungen oft grosse Schwankungen zeigt und der maximale Blutzuckerwert häufig Unterschiede von mehr als 0,04% aufweist, was bei unserer Probekost—wie folgende Tabelle zeigt—nicht oder nur in seltenen Ausnahmefällen vorkommt.

Bei folgenden Untersuchungen haben wir für denselben Menschen stets die gleiche Sorte Reis gebraucht, um die Kohlenhydratzufuhr immer gleich zu halten.

TABELLE VI.

Name u. Alter	Diagnose	Datum	Blutzuckergehalt (%)									Grösster Diff. d. max. Blutzuckergeh. bei denselben Personen
			Vor dem Frühstück.	1/4 St. n.d. Esse.	1/2 St.	3/4 St.	1 St.	1 1/2 St.	2 St.	3 St.	Maxim. Wert	
O. A. 36.	Gesund	25. VII. 1919.	0,082	0,098	0,112	0,103	0,086	0,091	0,098	0,084	0,112	0,009
		4. VIII.	0,081	0,092	0,110	0,106	0,100	0,088	0,085	0,085	0,110	
		12.	0,083	0,104	0,110	0,104	0,100	0,083	0,084	0,080	0,110	
		14. XII.	0,075	0,092	0,103	0,086	0,082	0,078	0,087		0,103	
		15.	0,080	0,095	0,111	0,094	0,085	0,095	0,095		0,111	
		17.	0,073	0,104	0,106	0,101	0,089	0,104	0,089		0,106	
T. A. 20.	Gesund	26. VII.	0,088	0,102	0,118	0,101	0,100	0,101	0,100	0,098	0,118	0,030
		7. VIII.	0,088	0,106	0,123	0,097	0,090	0,091	0,096	0,096	0,123	
		26.	0,086	0,111	0,125	0,100	0,096	0,089	0,104	0,100	0,125	
		8. XII.	0,077	0,094	0,107	0,097	0,099	0,088	0,090		0,107	
		12.	0,073	0,087	0,100	0,073	0,078	0,090	0,101		0,101	
		14.	0,077	0,084	0,095	0,077	0,074	0,084	0,091		0,095	
K. S. 13.	Gesund	28. VII.	0,090	0,105	0,114	0,111	0,118	0,117	0,115	0,090	0,118	0,020
		9. VIII.	0,081	0,098	0,109	0,110	0,111	0,102	0,107	0,101	0,111	
		14.	0,090	0,100	0,099	0,099	0,108	0,100	0,102	0,089	0,108	
		16. XII.	0,086	0,083	0,110	0,093	0,083	0,091	0,089		0,110	
		18.	0,084	0,098	0,115	0,110	0,105	0,103	0,088		0,115	
		20.	0,080	0,081	0,094	0,075	0,085	0,098	0,087		0,098	

Name u. Alter	Diagnose	Datum	Blutzuckergehalt (%)									Grösster Diff. d. max. Blutzuckergeh. bei denselben. Personen
			Vor dem Frühstück.	1/4 St. n. d. E.	1/2 St.	3/4 St.	1 St.	1 1/2 St.	2 St.	3 St.	Maxim. Wert	
T. K. 21.	Gesund	28. VIII. 1919.	0,087	0,114	0,126	0,129	0,110	0,090	0,088	0,086	0,129	0,030
		29.	0,081	0,105	0,121	0,104	0,099	0,091	0,105	0,115	0,121	
		30.	0,086	0,103	0,138	0,125	0,120	0,096	0,095	0,099	0,138	
		2. XII.	0,082	0,110	0,130	0,126	0,096	0,119	0,101		0,130	
		6.	0,075	0,089	0,108	0,082	0,074	0,064	0,094		0,108	
		9.	0,081	0,107	0,113	0,085	0,083	0,085	0,091		0,113	
Y. K. 28.	Gesund	31. VII.	0,097	0,112	0,127	0,129	0,116	0,098	0,095	0,097	0,129	0,031
		13. VIII.	0,085	0,103	0,110	0,106	0,090	0,087	0,076	0,087	0,110	
		18.	0,097	0,124	0,095	0,098	0,108	0,095	0,096	0,095	0,124	
		1. XII.	0,084	0,140	0,127	0,094	0,085	0,086	0,100		0,140	
		3.	0,089	0,141	0,123	0,101	0,097	0,092	0,095		0,141	
		5.	0,090	0,125	0,116	0,101	0,109	0,097	0,099		0,125	
T. A. 22.	Gesund	6. VIII.	0,081	0,107	0,115	0,106	0,108	0,111	0,095	0,095	0,115	0,011
		11.	0,098	0,126	0,116	0,115	0,115	0,091	0,118	0,106	0,126	
		16.	0,090	0,109	0,121	0,124	0,112	0,090	0,096	0,098	0,124	
		2. XII.	0,089	0,117	0,107	0,098	0,107	0,116	0,096		0,117	
			0,075	0,105	0,096	0,095	0,090	0,086	0,079		0,105	
K. H. 37.	Gesund	23. VII.	0,082	0,100	0,118	0,116	0,104	0,094	0,095	0,087	0,118	0,006
		24.	0,084	0,096	0,108	0,116	0,115	0,115	0,119	0,119	0,119	
		31.	0,086	0,104	0,119	0,124	0,123	0,102	0,116	0,107	0,124	
Ch. K. 52.	Neurale Muskelatrophie	2. VII.	0,087		0,108		0,116	0,123	0,110		0,123	0,029
		3.	0,074		0,090		0,094	0,084	0,077		0,094	
		4.	0,087		0,097		0,111	0,108	0,089		0,111	
		5.	0,092		0,087		0,099	0,100	0,094		0,100	
A. N. 33.	Chronische Manganvergiftung	6. VII. 1920.	0,085		0,100		0,110	0,099	0,096		0,110	0,023
		7.	0,086		0,117		0,133	0,129	0,128		0,133	
		9.	0,085		0,126		0,123	0,125	0,121		0,126	
		10.	0,085		0,118		0,113	0,103	0,095		0,118	
K. T. 32.	Chronische Manganvergiftung	2. VII.	0,088		0,135		0,109	0,113	0,100		0,113	0,016
		3.	0,085		0,106		0,105	0,089	0,086		0,106	
		5.	0,083		0,122		0,118	0,111	0,113		0,122	
		6.	0,088		0,114		0,104	0,087	0,102		0,114	

Name u. Alter	Diagnose	Datum	Blutzuckergehalt (%)								Grösster Diff. d. max. Blutzuckergeh. bei denselben. Personen	
			Vor dem Frühstü.	1/4 St. n.d. Esse.	1/2 St.	3/4 St.	1 St.	1 1/2 St.	2 St.	3 St.		Maxim. Wert
K. O. 16.	Hysterie	7. VII. 1920.	0,093		0,121		0,121	0,110	0,118		0,121	0,022
		8.	0,092		0,120		0,128	0,118	0,108		0,128	
		9.	0,094		0,134		0,102	0,108	0,100		0,134	
		10.	0,088		0,117		0,125	0,107	0,104		0,125	

Gegen unsere Methode könnte man wohl einwenden, dass die aufgenommene Nahrung vor der Resorption zuerst durch Fermentwirkung in Traubenzucker umgewandelt werden soll, während bei der Zuckermethode von Anfang an leicht resorbierbare Glukose dargereicht wird. Aber die Annahme, dass die Geschwindigkeit der Zuckerresorption hier geringere Schwankung als dort zeige ist ganz unberechtigt, weil die Magenmotilität, welche auf die Resorption einen grossen Einfluss hat, durch die Reizwirkung der konzentrierten Zuckerlösung und durch das ab und zu vorkommende Übelkeitsgefühl je nach den Fällen verschieden stark verlangsamt wird. Die Tatsache, dass die Schwankung der alimentären Hyperglykämie bei der Zuckermethode stärker als bei unserem Verfahren auftritt sollte eher darauf hindeuten, dass die Schwankung der Zuckerresorption dort grösser als hier ist.

Obwohl die alimentäre Hyperglykämie durch Vergrösserung der Kohlenhydratzufuhr im allgemeinen verstärkt wird, ist dieser Einfluss doch nicht so auffallend. Von vornherein halten wir es also für höchst wahrscheinlich, dass Ungleichheiten im Stärkegehalt des Reises bei unserem Verfahren auf das Resultat keinen nachweisbaren Einfluss ausüben. Um diese Vermutung zu bestätigen, haben wir folgende Untersuchung ausgeführt.

Versuch: Weil der Stärkegehalt des lufttrockenen Reises zwischen 70 und 80% schwankt, kann der Unterschied der aufgenommenen Kohlenhydrate bei Verabreichung von 100 g Reis im maximalen Fall 10 g betragen. Nun haben wir zwei Gesunden einmal 70 g und ein andermal 80 g Kohlenhydrat gegeben und die alimentäre Hyperglykämie in beiden Fällen mit einander verglichen. Weil der Stärkegehalt des Reises, welchen wir bei diesem Versuch benutzten, 75% betrug,

haben wir den Versuchspersonen 93 g (enthaltend 70 g Kohlenhydrat) resp. 107 g Reis (enthaltend 80 g K.H.) als Frühstück mit zwei Hühnereiern gegeben.

TABELLE V.

		Fall I. H. Y. 24j. gesund		Fall II. T. M. 34j. gesund	
Datum. 1921.		9/III	22/III	11/III	22/III
Dargereichte Reismenge (g)		107	93	107	93
Butlzucker gehalt %	Vor dem Frühstück.	0,070	0,079	0,085	0,078
	1/2 Std. n. d. Essen.	0,088	0,113	0,088	0,106
	1 " " " "	0,074	0,089	0,102	0,100
	1-1/2 " " " "	0,067	0,074	0,095	0,086
	2 " " " "	0,071	0,065	0,096	0,096

Bei allen diesen Versuchen wurde der Harn stündlich, aber immer mit negativem Resultate, auf Zucker untersucht.

Wie die Tabelle zeigt, fiel die alimentäre Hyperglykämie im zweiten Falle bei beiden Versuchen fast gleich stark aus; im ersten Falle wurde sie sogar bei Verabreichung von 93 g Reis etwas stärker gefunden als nach der Aufnahme von 107 g Reis.

Dieser Versuch zeigt unzweideutig, dass die Ungleichheit der Kohlenhydratzufuhr, wie sie bei Verabreichung von verschiedenen Arten Reis zustandekommt und so bei unserem Untersuchungsverfahren stets unterhalb 10 g liegt, beim Gesunden keinen nennenswerten Einfluss auf die alimentäre Hyperglykämie ausübt. Daraus folgt, dass man jede Art Reis als Probekost ruhig verabreichen kann, ohne seinen Kohlenhydratgehalt berücksichtigen zu müssen.

Zunächst könnte wohl auch die Konsistenz des gekochten Reises hier in Frage kommen, weil es von vornherein ganz gut möglich ist, dass weich gekochter Reis leichter verdaut wird als der hart gekochte, und dass so der Grad der alimentären Hyperglykämie dadurch gewissermassen beeinflusst wird. Nun haben wir 100 g lufttrockenen Reis einmal ganz gewöhnlich, nämlich mit etwa anderthalb Volumen Wasser, und ein andermal unter Zusatz von fünf Volumen Wasser breig gekocht. Dann wurden beide Reisspeisen den Versuchspersonen mit zwei Hühnereiern dargereicht.

TABELLE VI.

		Fall I T. M. 45j.				Fall 2. K. M. 33i.			
Diagnose		Renale Glykosurie				Leichte Zuckerkrankheit			
Datum. 1920.		9. X.	10. X.	12. X.	13. X.	7. X.	8. X.	9. X.	10. X.
Arten der Kost		gew. gek. Reis	Reis- brei	gew. gek. Reis	Reis- brei	gew. gek. Reis	Reis- brei	gew. gek. Reis	Reis- brei
Blut-Zucker. %	Vor dem Frühstück	0,078	0,076	0,074	0,075	0,083	0,070	0,076	0,081
	1/2 Std. n. d. Essen	0,135	0,146	0,128	0,143	0,156	0,122	0,127	0,140
	1 " " " "	0,136	0,099	0,117	0,109	0,165	0,135	0,141	0,140
	1-1/2 " " " "	0,101	0,093	0,093	0,104	0,142	0,118	0,131	0,119
	2 " " " "	0,117	0,086	0,093	0,084	0,141	0,099	0,118	0,092
	3 " " " "	0,088	0,083	—	—	0,085	0,094	0,091	0,082
Harn-Zucker. g/dl (g).	Vor dem Essen	0,36	0,41	0,33	0,38	(—)	(—)	(—)	(—)
	1 Std. n. d. Essen	3,33 (2,00)	0,87 (1,74)	2,85 (1,51)	0,65	1,14 (1,07)	0,72 (0,50)	0,77 (0,22)	1,17 (1,64)
	2 " " " "	1,56 (0,64)	0,50 (0,38)	1,41 (0,44)	0,40	0,86 (1,19)	1,02 (0,32)	1,66 (0,45)	1,07 (0,70)
	3 " " " "	1,28 (0,31)	0,46 (0,11)			0,65 (0,40)	(—)	1,00	(—)

Im Fall I hat die alimentäre Hyperglykämie nach dem Reisbrei einen etwas höheren Wert als nach gewöhnlich gekochtem Reis erreicht. Trotzdem wurde die Glykosurie hier stärker als dort gefunden, was wohl darauf beruht, dass die Hyperglykämie nach dem Reisbrei steiler abfiel. Im Fall 2 kann man keinen sicheren Unterschied zwischen beiden Versuchen beobachten.

Dieser Befund, dass zwischen Hyperglykämien nach Reisbrei und nach gewöhnlich gekochtem Reis kein auffallender Unterschied besteht, beweist unzweideutig, dass es ganz unnötig ist, bei unserem Verfahren auf die Konsistenz des gekochten Reises irgend wie achtzugeben.

Weil beim Gesunden die alimentäre Hyperglykämie auch bei ganz gleicher Kost stets eine gewisse Schwankung zeigt und eine kleine Mengenverschiedenheit in der Kohlenhydratzufuhr nicht merklich das Untersuchungsergebnis beeinflusst, kann man bei der Assimilationsbestimmung nach unserem Verfahren die Zulagen von Eiern und Gemüse sowie die Zubereitung der Probekost bis zu einem gewissen Grade nach dem Belieben des Kranken verändern.

Endlich sei auch erwähnt, dass 100 g Reis nach gewöhnlichem Kochen 250 bis 300 g zumeist ca. 270 g wiegen. Man kann also bei klinischer Untersuchung statt 100 g lufttrockenen Reises auch 270 g gekochten Reis nehmen.

Anhangsweise wollen wir hier einige Beispiele von Fällen geben, wo die Kohlenhydratassimilation ganz leicht affiziert ist.

Beispiel I. N.T. 25j. Leichte Zuckerkrankheit.

Der Kranke hat keine subjektive Klage. Als er vor kurzem mit einer anderen Krankheit einen Arzt besuchte, wurde die Glykosurie zufällig gefunden. Weil der Harn aber bei später einigemal wiederholten Untersuchungen immer zuckerfrei blieb, wurde der Kranke von dem Arzte zu uns geschickt, um die Frage zu entscheiden, ob seine Assimilationskraft für Kohlenhydrat normal sei. Wie folgende Tabelle zeigt, hat die Untersuchung nach unserem Verfahren unzweideutig bewiesen, dass er nicht kohlenhydratstoffwechselgesund ist.

TABELLE VII.

	Blutzuckergehalt, %	Glykosurie.
Vor d. Probefrühstück.	0,099	(—)
1/2 Std. nach dem Essen.	0,155	
1 " " " "	0,149	(—)
1-1/2 „ " " "	0,136	
2 " " " "	0,134	(—)
3 " " " "	0,128	(—)

Beispiel 2. T.O. 44 jährige Frau. Leichte Zuckerkrankheit.

Mit deutlichen diabetischen Symptomen wurde die Kranke in unsere Klinik aufgenommen. Bald besserte die Krankheit sich bedeutend, so dass die Kranke gewöhnliche Kost ohne Glykosurie vertragen konnte. Als ihre Assimilationskraft aber am 25. August nach unserem Verfahren bestimmt wurde, hat sich erwiesen, dass sie noch ziemlich stark affiziert ist und die Glykosurie nur wegen ihrer sehr hohen Zuckerausscheidungsschwellen trotz starker Hyperglykämie nicht in Erscheinung tritt. Durch weitere Fortsetzung

der Behandlung ist die Assimilationskraft immer besser geworden, so dass sie am 4. September nur ein wenig schwächer als normal gefunden wurde.

TABELLE VIII.

Datum. 1920.	25. VIII.		4. IX.	
	Blutzucker- gehalt %	Glykosurie	Blutzucker- gehalt %	Glykosurie
Vor d. Probefrühstück	0,094	(—)	0,089	(—)
$\frac{1}{2}$ Std. nach dem Essen	0,180		0,140	
1 „ „ „ „	0,191	(—)	0,148	(—)
$1\frac{1}{2}$ „ „ „ „	0,211		0,147	
2 „ „ „ „	0,199	(—)	0,136	(—)

ZUSAMMENFASSUNG.

1) Die Bestimmung der Zuckerassimilationskraft, welche durch den Harnbefund (Glykosurie) nach grosser Zuckerzufuhr beurteilt wird, muss jetzt bei wissenschaftlicher Forschung wie bei klinischer Untersuchung als ganz unzuverlässig verworfen werden, weil die Zuckerausscheidungsschwelle individuell eine ziemlich grosse Schwankung zeigt.

2) Bei der Untersuchung der alimentären Hyperglykämie nach Traubenzuckerzufuhr kann man das Untersuchungsergebnis unter Umgehung des Schwellenwertes eindeutiger beurteilen. Aber den gebräuchlichen Methoden, bei welchen reichlich Zucker dargereicht wird, haften verschiedene Nachteile an, welche bei unserem Verfahren nicht in Frage kommen.

3) Unsere Bestimmungsmethode der Assimilationskraft für Kohlenhydrat besteht darin, dass man dem Versuchspersonen morgens im nüchternen Zustande unsere Probekost verabreicht und direkt davor und nach dem Essen halbstündlich zwei Stunden lang den Blutzuckergehalt untersucht. Wenn die alimentäre Hyperglykämie dabei 0,14% nicht überschreitet und der Blutzuckergehalt in einer oder anderthalben Stunden nach dem Essen sich

schon dem nüchternen Wert annähert, so kann man annehmen, dass die Kohlenhydrat assimilierende Kraft der Versuchspersonen ganz normal ist. Wenn aber der Blutzuckergehalt über 0,15% ansteigt oder die Hyperglykämie über zwei Stunden andauert, so muss man je nach der Intensität der Hyperglykämie verschieden starke Beeinträchtigung der Assimilationskraft annehmen.

4) Unsere Probekost besteht aus 100 g Reis (lufttrocken gewogen, dann gekocht), zwei Hühnereiern und einer geringen Menge Gemüse. Man braucht hierbei auf die Ungleichheit im Kohlenhydratgehalt des Reises und auf die Konsistenz des gekochten Reises keine Rücksicht zu nehmen.

LITERATUR.

- Goto, K. u. Kuno, N. (1921): Studies on renal threshold for glucose. Arch. of int. med. **27**. 224.
- Graham, G.: zit. n. Goto u. Kuno.
- Grünthal, zit. n. Salomon.
- Hahn, A. u. Offenbacher (1919): Über die diagnostische Verwertung der glykämischen Reaktion. Deutsch. med. Wochenschr. 1919, 1298.
- Hamman, L. u. Hirschmann, I. I. (1920): Studies on blood sugar. Arch. of int. med. **20**. 761.
- Hopkins, A. R. (1915): Am. J. M. Sc. **147**. 254.
- Jakobsen A. Th. B. (1913): Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Nahrungsmittel auf den Blutzucker bei normalen, zuckerkranken u. graviden Personen. Bioch. Zeitschr. **56**. 471.
- Janney, N. W. u. Isaacson V. I. (1918): A blood sugar tolerance test. J.A.M.A. **70**. 1131.
- Maclean M. u. de Wesselow, O. L. V. (1921): Estimation of sugar tolerance. Quart. jour. of med. **14**. 103.
- Salomon, H. (1921): Die Differentialdiagnose der Schwangerschaftsglykosurie und des Diabetes bei Schwangerschaft. Münch. med. Wochenschr. 386.
- Sakaguchi, K. (1918): Beiträge zur Diabetesforschung. I Mitt. Über den Einfluss v. Menge, Art und Zeit der Kohlenhydratzufuhr auf den Blutzuckergehalt beim gesunden Menschen. Mitt. d. med. Fakultät d. kaiserl. Universit. zu Tokyo. **20**. 345.
- Williams, J. R. u. Humphreys, E. M. (1919): Observations on tolerance and rate of utilization of glucose in a series of individuals exhibiting various degree of diabetes mellitus. Arch. of int. med. **23**. 559.

BEITRÄGE ZUR GLYKOLYTISCHEN WIRKUNG DER LEUKOCYTEN. I.

VON

KANSHI FUKUSHIMA.

(Aus der II. med. Klinik, Osaka Medizinische Akademie, Osaka.

Direktor: Prof. Dr. S. Kosawa),

(Eingegangen am 28. Dezember 1921.)

Durch die Arbeiten von Arthus, Colenbrander, Seegen und Lépine ist es klar, dass die Leukocyten eine glykolytische Wirkung entfalten. Nach D. Y. Meyer (1910) sollen die Leukocyten die Profermente der glykolytischen Wirkung des Blutes enthalten, die durch das Pankreashormon aktiviert werden. Die glykolytische Wirkung des Blutfibrins soll auch, nach Sieber (1903, 1905) im Zusammenhang mit den Leukocyten stehen. P. A. Levene und G. M. Meyer (1912) zeigten, dass der Traubenzucker unter der Wirkung der Leukocyten zu Milchsäure sich spaltete.

Zu verfolgen, in welcher Weise die glykolytische Wirkung der Leukocyten des Warmblüters stattfindet, habe ich auch die folgenden Experimente ausgeführt.

METHODISCHES.

Zur Gewinnung der Leukocyten injiziert man Bouillon in die Bauchhöhle des Kaninchens. Durch Laparotomie nach bestimmter Zeit bekommt man eine getrübbte Flüssigkeit, die Leukocyten enthält. Bekanntlich haben die Leukocyten die Neigung, nicht nur mit einander zu verkleben, sondern auch ausserhalb des Körpers mit Serum zu koagulieren. Solche Neigung zu verhüten und in günstiger H^+ -Konzentration $pH=7.765$ zu untersuchen, benützte ich das Zitratgemisch nach Rona u. Michaelis (Rona, 1912) als Untersuchungsmedium und als Waschungsflüssigkeit der aus der Bauch-

höhle gewonnenen Leukocyten. Eine bestimmte Menge Leukocyten, welche durch das Zitratgemisch mittelst der Centrifuge gereinigt wurden, bringt man ins Zitratgemisch von bestimmter Menge mit einer isotonischen Zuckerlösung von bestimmter Menge. Man lässt diese Mischung im Thermostat (38° C.) stehen und schätzt die glykolytische Wirkung der Leukocyten durch die Menge des Traubenzuckers im bestimmten Zeitraum (24, 48, 72, 96, 120 St.) nach Bertrand'scher Methode. Durch den Verlust des Traubenzuckers kann man die Intensität der glykolytischen Wirkung der Leukocyten kennen lernen.

Alle Versuche wurden unter strenger Aseptik durchgeführt indem man am Anfang und Ende der Versuche keine Entwicklung von Bakterien durch aerobe und anaerobe Kulturen konstatiert.

EXPERIMENT I.

Zuerst habe ich den normalen glykolytischen Vorgang der Leukocyten in der optimalen H⁺-Konzentration längere Zeit hindurch beobachtet.

FALL 1.

Leukocytenemulsion 5.0 ccm + Zitratgemisch 17.0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 3.0 ccm (im Thermostat 38.0°C.). Reduzierte Menge des Kupfersulfates in der Mischung 5.0 ccm nach Bertrand bestimmt.

Zeit des Aufenthalts im Thermostat (Stunden)	0.	24	48	72	96
Reduzierte Kupfermenge (mg)	35.64	33.16	33.68	35.64	35.64
Differenz (mg)	—	2.48	1.96	0	0

FALL 2.

Leukocytenemulsion 5.0 ccm + Zitratgemisch 12.0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 3.0 ccm (im Thermostat 38.0°C.). Reduzierte Menge des Kupfersulfates in der Mischung 2.0 ccm. nach Bertrand bestimmt.

Zeit des Aufenthalts im Thermo- stat (Stunden)	0	24	48	72	96
Reduzierte Kupfermenge (mg)	21.78	19.80	21.58	21.68	21.78
Differenz (mg)	—	1.98	0.20	0.10	0

FALL 3.

Leukocytenemulsion 10.0 ccm + Zitratgemisch 25.0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 5.0 ccm (im Thermostat 38,0°C). Reduzierte Menge des Kupfersulfates in der Mischung 5.0 ccm nach Bertrand bestimmt.

Zeit des Aufenthalts im Thermo- stat (Stunden)	0	24	48	72	96
Reduzierte Kupfermenge (mg)	20.15	19.63	19.11	20.15	20.15
Differenz (mg)	—	0.53	1.04	0	0

Während die reduzierte Kupfermenge innerhalb 24–48 Stunden deutlich sich vermindert, vermehrt sie sich nach 48–72 Stunden allmählich, und schliesslich nach 96–120 Stunden zeigt sie die gleiche Menge wie im Anfang des Versuchs. Nach diesem Resultat kann man annehmen, dass die Leukocyten ihre glykolytische Wirkung 24–48 Stunden lang erhalten können und nach diesem Zeitpunkt verloren gehen.

EXPERIMENT II.

Nächst habe ich untersucht, ob das Zitratgemisch ohne Leukocyten eine Spaltungswirkung auf den Traubenzucker habe.

Isotonische Traubenzuckerlösung 30. ccm + Zitratgemisch 17.0 ccm (im Thermostat 38,0°C.). Reduzierte Menge des Kupfersulfates in der Mischung 2.0 ccm nach Bertrand bestimmt.

Zeit des Aufenthalts im Thermo- stat (Stunden)	0	24	48	72	96
Reduzierte Kupfermenge (mg)	34.65	34.65	34.65	34.65	34.60
Differenz (mg)	—	0	0	0	0

EXPERIMENT III.

Zur Versicherung, ob die glykolytische Wirkung wirklich nach 24–48 Stunden verloren gehe, habe ich folgenden Versuch angestellt.

Leukocytenemulsion 5.0 ccm und Zitratgemisch 12.0 ccm stehen im Thermo stat (38.0°C.) 24 Stunden lang und dann isotonische Traubenzuckerlösung 3.0 cm hinzugesetzt. Reduzierte Menge des Kupfersulfates in der Mischung 5.0 ccm nach Bertrand bestimmt.

Zeit des Aufenthalts im Thermo- stat (Stunden) nach dem Zusatz der Zuckerlösung	0	24	48	72	96
Reduzierte Kupfermenge	54.45	54.45	54.25	54.45	54.45
Differenz	0	0	0.2	0	0

Es wird klar sein, dass die Leukocyten nach 48 Stunden ihre glykolytische Wirkung verloren haben, wenn die Loukocyten im Zitratgemisch, welche 48 Stunden lang im Thermostat gestanden haben, durch den Zusatz des Traubenzuckers im weiteren Verlauf fast keine Verminderung der reduzierten Kupfermenge verursachten. Wie man aus der obigen Tabelle sehen kann, bleibt die glykolytische Wirkung der Leukocyten schon nach 48 Stunden inaktiv. Diese Erscheinung stimmt fast mit den Resultaten von J. Edelmann und Braunstein überein.

Zu entscheiden, ob entweder die Spaltungsprodukte des Traubenzuckers, die unter der glykolytischen Wirkung der Leukocyten gebildet werden, nach Aufhebung der Wirkung wieder zum Trau-

benzucker sich zurückbilden, oder die Spaltungsprodukte im Laufe der Zeit weiter zu Substanzen, die noch die stärkere Reduktionskraft des Kupfersulfates haben, umgebildet werden, muss man weitere Untersuchungen vornehmen.

EXPERIMENT IV.

Wenn man frisch gewonnene Leukocyten zum Gemisch, in welchem die von Anfang an vorhandenen Leukocyten schon nach 48 Stunden ihre glykolytische Wirkung verloren haben, hinzusetzt, findet die Verminderung der reduzierten Kupfermenge weitere 24-48 Stunden lang statt. Nach diesem Zeitraum bemerkt man im weiteren Verlauf die Vermehrung der reduzierten Kupfermenge, wie bei Experiment I.

Leukocytenemulsion 10.0 ccm + Zitratgemisch 25.0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 5.0 ccm steht 48 Stunden lang im Thermostat, dann wieder 10.0 ccm frische Leukocyten hinzugesetzt und weiter beobachtet. Reduzierte Menge des Kupfersulfates in 5 ccm der Mischung bestimmt nach Bertrand.

Zeit des Aufenthalts im Thermostat (Stunden)	0	24	84	} hier frische Leukocyten zugesetzt		
Reduzierte Kupfermenge (mg)	19.37	19.11	18.85			
Differenz	—	0.26	0.52			

Zeit des Aufenthalts im Thermostat (St.) nach frischem Zusatz	0	24	48	72	96
Reduzierte Kupfermenge (mg)	14.04	11.05	10.66	11.70	12.35
Differenz	—	2.99	3.38	2.34	1.69

EXPERIMENT V.

Es ist schon von vielen Autoren berichtet worden, dass das Pankreashormon ein Aktivator für das glykolytische Enzym aus verschiedenen Organen und Geweben sei, z. B. von Cohnheim und Rahel Hirsch für das Enzym aus den Muskeln und der Leber, von Braunstein für das Enzym aus koaguliertem Blute. Vandeput und Lépine haben bei pankreaslosen Tieren die Abschwächung der glykolytischen Kraft des Blutes gefunden, und Starling hat die Verminderung des Zuckerverbrauchs des Herzens desselben Tieres bei künstlicher Durchblutung konstatiert.

Dagegen negierten Marcel-Landsberg (1915) und Mac Gigan (1912) die aktivierende Wirkung des Pankreashormons, weil die glykolytische Kraft des Blutes und der Blutkörperchen des pankreaslosen Tieres ganz gleich der des normalen geblieben ist. Dazu noch verhält sich die Menge des Zuckerverbrauchs bei Muskelübung ganz gleich, sowohl beim pankreaslosen Hunde, als auch beim normalen.

Neuerdings haben Levene und Meyer (1912) gezeigt, das Zusatz des Pankreaspulvers eine merkliche Verstärkung der glykolytischen Wirkung der tierischen Organe verursachen konnte.

Mein eigener Versuch über diesen Punkt negiert die aktivierende Wirkung des Pankreasgewebes auf die glykolytische Kraft der Leukoeyten, wie man aus folgender Tabelle sehen kann.

Leukoeytenemulsion 10.0 ccm + Zitratgemisch 25.0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 5.0 ccm + Pankreasstück ca. 10.0 g. Reduzierte Menge des Kupfersulfates in 5.0 ccm der Mischung nach Bertrand bestimmt.

Zeit des Aufenthalts im Thermostat (St.)	0	24	48	72	96
Reduzierte Kupfermenge (mg)	34.69	30.69	32.67	32.67	32.67
Differenz (mg)	—	4.00	2.02	2.02	2.02

Es ist interessant, dass Koinzidenz des Pankreasgewebes mit den

Leukocyten keine Vermehrung der reduzierten Kupfermenge nach 72–96 Stunden verursachen konnte, während eine Vermehrung derselben in dieser Zeitperiode stattfinden sollte.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die oben beschriebenen Resultate, welche die glykolytische Wirkung der Leukocyten im Zitratgemisch mit der optimalen H^+ -Konzentration zeigen und wobei die Intensität der Wirkung nach der Bestimmung der Reduktionsmenge des Kupfersulfates mittelst der Bertrand'schen Methode geschätzt wurde, möchte ich in folgenden Sätzen zusammenfassen.

1) Die reduzierte Kupfermenge vermindert sich allmählich mit der Zeit innerhalb 48 Stunden, d. h. die glykolytische Wirkung der Leukocyten dauert ca. 48 Stunden lang, aber bleibt nach diesem Zeitpunkt inaktiv.

2) Dann vermehrt sich die reduzierte Kupfermenge und nach 72 Stunden kehrt sie zur Kupfermenge, die man im Anfang des Experiments gefunden hat, zurück. Ob diese Tatsache sich auf die Synthese von Traubenzucker aus den labilen Spaltungsprodukten, welche unter der Wirkung der Leukocyten aus Traubenzucker gebildet werden, bezieht, muss man weiter genau studieren.

3) Weder der Pankreassaft noch das Pankreasgewebe haben beschleunigenden Einfluss auf die glykolytische Wirkung der Leukocyten.

LITERATUR.

- Arthur: cit. nach Oppenheimer, Die Fermente u. ihre Wirkng. **2**, 732.
 Braunstein, A. (1907): Zft. f. kl. Med. **51**.
 Colenbrander: cit. nach Oppenheimer, Die Fermente **2**, 732.
 Cohnheim: Zft. f. physiol. Chem. **39**, 336; **42**, 401; **43**, 547; **47**, 253.
 Mac Guigan (1912): Amer. Journ. of Physiol. **30**, 340.
 Hirsch, Rahel (1903): Hofmeister's Beiträge. **4**, 535.
 Lépine: cit. in Zft. f. kl. Med. **48**, (1903).
 „ (1890): Compt. Rend. **110**.
 Levene, P. A. and Meyer, G. M. (1912): Journ. of biol. Chem. **11**, 347; **12**, 265.
 Marcel-Landsberg (1915): Archiv. f. kl. Med. **115**.
 Meyer, D.Y. (1910): Zentralbl. f. Physiol. **23**.

- Rona, P (1912): Abderhalden's Handb. d. bioch. Arbeitsmeth. **V2**, 1095.
Seegen (1892): Wien. kl. W. **207**.
Sieher (1903; 1905): Zft. f. physiol. Chem. **39**; 44.
Starling (1912): Roy. Soc. Ser. **85**, **218**.
Vandeput: cit. in Oppenheimer's Die Fermentlehre. **2**, 751.

ÜBER DEN EINFLUSS DES OPTISCHEN DREHUNGS- VERMÖGENS AUF DIE ZELL-PERMEABILITÄT.

I. MITTEILUNG.

VON

YASHIRO KOTAKE und M. OKAGAWA.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut, Ōsaka Medizinische
Akademie, Ōsaka.)

(Eingegangen am 2. Januar 1922)

Es ist schon ziemlich lange bekannt, dass ein und dieselbe Verbindung, je nach ihrer Konfiguration, eine besondere physiologische Wirkung entfalten oder einen ganz verschiedenen Geschmack (oder Geruch) erwecken kann.

Nach den Untersuchungen von Cushny ist die physiologische Wirkung des Atropins, dl-Hyoscyamins, nichts anderes als eine Summe derjenigen des d- und l-Hyoscyamins, während die beiden optischen Antipoden mehr oder weniger von einander verschiedene Wirkung auf einzelne Organe zeigen. Es ist auch höchst wahrscheinlich, dass Adrenalin nur in der linksdrehenden Form wirksam ist. Das gleiche gilt von Skopolamin in Bezug auf seine peripheren Wirkungen.

Manche Verbindungen, z.B. Histidin, Asparagin u.a. schmecken je nach der Konfiguration ganz verschieden, von Hexahydro-o-diätylbenzylaminkarbonsäuren besitzt nur die cis-Form einen starken Geruch.

Der Einfluss der Konfiguration einer Verbindung auf ihr Verhalten gegen ein Organ oder eine Zellart ist noch nicht genügend geklärt; aber es ist jedenfalls zu vermuten, dass zwischen der Zellstruktur und der Substanz eine innige Beziehung physikalischer oder physiko-chemischer Natur existieren kann, die schliesslich auf eine Elektronenschwingung zurückzuführen wäre.

Wir fanden, dass das Kaninchen, und zwar dasselbe Indivi-

duum, unter gleichen Bedingungen bei der Tyrosinfütterung, unabhängig von der optischen Eigenschaft des Tyrosins, immer fast dieselbe Menge Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn ausgescheidet, während nur im Versuche mit l-Tyrosin verhältnismässig eine bedeuſame Menge Oxyphenylmilchsäure mit Sicherheit nachgewiesen wurde. Dieser Umstand ist durch asymmetrische Desaminierung des Tyrosins in den Zellen, wobei nur l-Tyrosin angegriffen wird, nicht ausreichend erklärbar, und es scheint uns sehr wahrscheinlich, dass eine Substanz durch ihr optisches Drehungsvermögen auf die Zell-Permeabilität irgend einen Einfluss ausübt.

Es ist sogar nicht ganz unmöglich, dass die Verschiedenheit der physiologischen Wirkung, des Geschmacks oder Geruchs, die von der Konfiguration einer Substanz abhängig gedacht wird, in gewissen Fällen durch das Permeabilitätsverhältnis hervorgebracht wird.

EXPERIMENTELLES.

Als zu untersuchende Substanz wurde deswegen Oxyphenylmilchsäure gewählt, weil einerseits alle optischen Modifikationen derselben durch Synthese und nachherige Spaltung in die optischen Antipoden mittels Morphins leicht gewonnen werden, und weil anderseits die l-Form, nach unseren Untersuchungen, wahrscheinlich ein physiologisch-normales intermediäres Produkt darstellt, und es demnach von besonderem Interesse ist, ihr Permeabilitätsverhältnis zu untersuchen. Ausserdem ist es sehr bequem für unsere Untersuchungen, dass die Säure, selbst in kleinen Mengen, mit Millonschem Reagens ganz leicht qualitativ und sogar quantitativ bestimmt werden kann.

Oxyphenylmilchsäure ist in jeder Form sehr leicht löslich in Wasser, Alkohol und Äther, und die Lösung gibt selbstverständlich eine intensive Millonsche Reaktion, die in unseren Untersuchungen zur Bestimmung der Säure angewandt wurde, und zwar wurde das Reagens hierbei nach M. Weiss aus folgenden zwei Lösungen bereitet :

I. Lösung: 10%ige Quecksilberoxydsulfatlösung in 5%iger Schwefelsäure.

II. Lösung: 0,5%ige Natriumnitritlösung.

Es wurde zunächst durch besondere Versuche nachgewiesen, dass die Intensität der Millonschen Reaktion in den verdünnten Lösungen der Säure wie folgt mit der Konzentration parallel läuft, und dass auch die Reaktion der drei Isomeren in einer gleichen Konzentration gleichstark ausfällt:

TABELLE I.

Die relative Farbenintensität bei verschiedener Konzentration.

Form der Isomeren	Konzentr. der Säure	Relat. Farbenintensität (kolorimetrisch bestimmt)
dl-Form	1: 2000	3,01
	1: 4000	1,48
	1: 8000	0,73
	1: 16000	0,37
	1: 32000	0,19
	1: 64000	0,10
d-Form	1: 2000	2,98
	1: 4000	1,48
	1: 8000	0,73
	1: 16000	0,36
	1: 32000	0,18
	1: 64000	0,10
l-Form	1: 2000	2,99
	1: 4000	1,51
	1: 8000	0,82
	1: 16000	0,40
	1: 32000	0,21
	1: 64000	0,10

TABELLE II.

Vergl. Untersuchung der Farbenintensität bei drei Isomeren.
(Konzentr. der Säure 1:2000)

Form der Säure	Relat. Farbenintensität (kolorimetrisch bestimmt)
dl	1,0
d	1,0
l	1,0

Als Zellen benutzten wir die Blutkörperchen des Kaninchens; sie wurden vor der Benutzung wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, wobei natürlich die weissen grössten-theils weggenommen wurden.

Unsere Permeabilitätsuntersuchungen wurden immer in schwach alkalischem Medium ausgeführt. Wenn auf diese Weise auch der sogenannte Verteilungsquotient keine grosse Bedeutung besitzt, da das Natriumsalz der Oxyphenylmilchsäure ganz lipoidunlöslich ist, so haben wir doch nicht versäumt, einmal mit der freien Säure in jeder Form die Öl-Wasser-Verteilung zu bestimmen. Es ergab sich das Resultat, dass jede optische Modifikation beinahe denselben Wert besitzt, und zwar die relative Öllöslichkeit so klein war, dass das nach der Durchschüttelung abgetrennte Öl nur eine sehr schwache Millonsche Reaktion gab. Es schien dabei die dl-Modifikation am stärksten in das Öl übergegangen zu sein.

Die sogenannte Oberflächenaktivität wurde auch einige Male nach der Steighöhenmethode bestimmt. Hier konnten wir wieder keinen bemerkenswerten Unterschied in den drei Formen finden.

Bei unseren Untersuchungen der Permeabilitätsverhältnisse haben wir auf die Beziehung des osmotischen Drucks und der Reaktion des Mediums besondere Aufmerksamkeit verwendet. Alle Operationen wurden natürlich aseptisch ausgeführt.

Das Gemisch, das aus den Blutkörperchen und d-, l-, od. dl-Oxyphenylmilchsäure in physiologischer Kochsalzlösung bestand, wurde 4-5 Stunden lang in einem Brutofen stehen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurde jede Probe vorsichtig zentrifugiert, die

obenstehende, klare, farblose Flüssigkeit abgetrennt und genau nach der Angabe von M. Weiss behandelt, indem in 3 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit 2 ccm der I. Lösung und 3 gtt der II. Lösung in Anwendung kamen.

Die Resultate sind kurz in folgenden Tabellen zusammengestellt.

TABELLE III.

Versuchsreihe	Oxyphenylmilchsäure (1:2000) in ccm	opt. Drehung	Blutkörperchen (nicht ganz mediumfrei) in ccm	Relat. Farbenintensität (kolorimetr. bestimmt)
I	6	l	6	1,0
	6	d	6	1,4
	6	dl	6	1,7
II	7	l	7	1,0
	7	d	7	1,4-1,5
	7	dl	7	1,7-1,8

Aus den Versuchen, deren zwei, wie auch die anderen, die hier nicht angegeben sind, ganz übereinstimmende Resultate ergaben, ist ersichtlich, dass Oxyphenylmilchsäure, von den drei optischen Isomeren, nur in der l-Form leicht durchlässig in das rote Blutkörperchen ist, während die d- oder dl-Form sehr schwer oder fast gar nicht einzudringen vermag.

Sicherheitswegen haben wir weiter mit dl-Oxyphenylmilchsäure einen Versuch angestellt, um zu bestimmen, ob eine Mengenabnahme der Säure in der Flüssigkeit vor und nach dem Versuche stattfindet. Hierbei gaben aber die beiden Flüssigkeiten ungefähr gleichstarke Millonsche Reaktion, so dass wir mit Recht behaupten können, dass die Säure, beim Stehenlassen mit den Blutkörperchen, mindestens in einigen Stunden weder zerstört wird, noch in dieselben übergeht. So ist erwiesen, dass der obenangegebene Unterschied der Resultate in den Versuchen mit den drei Isomeren wenigstens nicht vorwiegend durch die Zerstörung der einen Form

hervorgebracht ist. Es wird vielmehr, wenn man die kolorimetrischen Zahlen in Betracht zieht, angenommen, dass die l-Form dabei einige Zeit unzerstört in den Blutkörperchen und der Flüssigkeit beinahe gleichmässig verteilt ist.

SCHLUSS.

Somit glauben wir nachgewiesen zu haben, dass die Permeabilität der Zelle gegenüber einer Substanz auch durch die optische Eigenschaft der letzteren beeinflusst werden kann. Übrigens möchten wir bei dieser Gelegenheit unter anderen mit E. Erlenmeyer darauf hinweisen, dass das optische Drehungsvermögen oder "die von asymmetrischen Molekülen ausgehende Kraft" in den biologischen oder physiologischen Verhältnissen, die bisher noch nicht eingehend untersucht sind, eine wichtige Rolle spielen kann.

LITERATUR.

- Abderhalden u. Weil, (1912): Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**, 447.
Abderhalden, Lehrb. d. physiol. Chem. II, 223.
Cushny, (1904): Journ. of Physiol. **30**, 176; (1905) **32**, 501; (1908) **37**, 130.
E. Erlenmeyer, (1919): Bioch. Z. **97**, 261.
Kodama, (1920): Journ. of Tokyo Chem. Soc. **41**, 495.
Kotake u. Okagawa, (1921): Mitteil. d. Med. Gesell. zu Ōsaka. **20** Heft 6.
Mori, (1921): Mitteil. d. Med. Gesellsch. zu Ōsaka **20** Heft 6.
Putti, (1887): Ber. d. Deutsch. Chem. Gesell. **19**, 1693.
M. Weiss, (1919): Biochem. Z. **97**, 170.

STUDIES ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF PHOSPHOLIPIN.

I. The precipitation of lecithin-hydrosol by electrolytes.

By

SAMURO KAKIUCHI.

*(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry,
Tokyo Imperial University, Tokyo.)*

(Received for publication, December 1, 1921.)

I. INTRODUCTORY.

Protoplasm is composed of the colloidal mixture of proteins and lipoids, and is liable to alter its state of aggregation according to the conditions under which it is placed. It is, therefore, very important for the study of cell physiology to know the physico-chemical relation playing among them. The physico-chemical properties of proteins have been elucidated step by step in the last few decades (Robertson, 1918). But our knowledge of the physicochemistry of lipoids has been limited, and it is our purpose to state some of our experimental results obtained in this line.

As we all know lecithin is an essential constituent of cell-lipoids. In contact with water it disintegrates into small particles and forms a colloidal solution. From such a solution it is precipitated by addition of some electrolytes. It was stated by W. Koch (1903) that the lecithin could be precipitated from its solution only by the addition of salts with bivalent cations, while such a change is not produced either by addition of monovalent, or of trivalent cations. It was, however, shown by Porges and Neubauer (1908) that this statement was not quite correct, as the addition of trivalent cation causes an incomplete precipitation of lecithin. But they did not study the conditions in this respect very thoroughly. As the lecithin, moreover, constitutes what is relatively a simply composed colloid, it seemed to me that it is also

worth-while to study the relation of the precipitation of organic colloid by the example of lecithin. From such a viewpoint I had at first taken up the study of precipitation of lecithin-hydrosol by electrolytes.

II. THE PRECIPITATING ACTION OF THE SALTS.

As can be shown by the electrophoresis test, the lecithin particles have a negative charge in their watery solution. It is therefore quite conceivable that the precipitation can be favoured noticeably by the addition of electrolytes with polyvalent cation. While salts with monovalent cation such as KCl, NaCl etc. have no effect on the solution, the addition of salts with bivalent cation as CaCl_2 , BaCl_2 , MgCl_2 etc. causes the precipitation of the lecithin. As to the salts with trivalent cation Koch saw no precipitation while Porges and Neubauer got some incomplete precipitation. Our experiments showed that there is only a quantitative difference between salts of bivalent and trivalent cations.

Experiment 1.

To each of the series of test tubes containing 2 cc. of 0.5 per cent lecithin solution an equal volume of salt solution of different concentration was added and shaken quite evenly ten times and after five minutes the observation on precipitation was made, the results of which are shown in the following table. The lecithin used in all of following experiments was prepared from ox-brain or egg-dotter by the method of MacLean.

As may be seen in this table, while the addition of salt with monovalent cation has no precipitating action on lecithin solution, the salt with bivalent or trivalent cations causes the precipitation at a certain range of its concentration. The difference between these two kinds of salt lies in two points. First, the concentration of salt with bivalent cation required is much larger than that of salt with trivalent cation. Second, the range of precipitating concentration is quite broad in salt with bivalent cation, while it is very narrow in the case of salt with trivalent cations. These

TABLE I.

Salt.	Concentration of salt solution added.										
NaCl	No precipitation occurred.										
KCl											
KCNS											
	mol 2	mol 1	mol .5	mol .2	mol .1	mol .05	mol .04	mol .025	mol .02	mol .0125	mol 0.01
CaCl ₂	—	±	±	++	+	+	+	+	±	—	—
BaCl ₂	—	—	±	+	+++	+++	++	+	—	—	—
MgCl ₂	—	±	±	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—
AlCl ₃	0.7 mol 3200	0.6 mol 3200	0.55 mol 3200	0.1 mol 6400	0.95 mol 6400	0.9 mol 6400	0.85 mol 6400	0.8 mol 6400	0.9 mol 6400		
	—	—	+	+	+	+	+	—	—		

circumstances explain why Koch had overlooked the precipitation by the salt with trivalent cation. It is quite noticeable that the author prepared sometimes a sample of lecithin the solution of which gave only precipitation by addition of Aluminium chloride solution of 1.05/6400 mol, not either of 1/6400 nor of 1.1/6400 mol. The purer the sample was, the shorter the range seemed to be. This very point is a proof that we are having here the precipitation caused by neutralisation of electrically charged bodies by the oppositely charged ions. That the excess of an electrolyte may cause the redissolution of precipitates by over-neutralisation of electrical charge of the particles was proved by Burton (1909) in the case of inorganic colloid such as gold, arsenic trisulphide etc.

III. SOME CONSIDERATION ON HARDY-SCHULZE'S LAW.

Although we have seen that the polyvalent cation has always a much greater effect upon the precipitation of lecithin from its solution than the monovalent cation, and that the valency of the cation determines mainly the precipitating power of the electrolyte on lecithin, we can not neglect the effect of anion, the electric charge of which is the same as that of the lecithin particles themselves.

To study the effect of anion it seemed to me desirable that we take the range of the precipitating concentration of the most effective salt as the standard and follow its change caused by the addition of different amounts of different salts with various anions.

Experiment 2.

To the mixture of 1 cc. of 0.5 per cent lecithin solution and 1 cc. of distilled water 2 cc. of the aluminium chloride solution of different concentration were added and the minimal concentration of the salt for the total precipitation of lecithin, which can be recognized by the clearness of the filtrate, was found to be 0.9/6400 mol. This being taken as the standard, the minimal concentration of aluminium chloride was noted at times where the solution of various salts of different concentration were used instead of distilled water in the above experiment. The results of these experiments are shown in the following table.

TABLE II.

Kind of salt.	Concentration of salt added.	Minimal concentration of AlCl_3 needed.
KCl	0	$\frac{0.9}{6400}$ m
	$\frac{m}{64}$	$\frac{0.95}{6400}$ m
	$\frac{m}{32}$	$\frac{0.95}{6400}$ m

Kind of salt	Concentration of salt added	Minimal concentration of AlCl_3 needed
CaCl_2	0	$\frac{0.9}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{128}$	$\frac{0.85}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{64}$	$\frac{0.75}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{32}$	$\frac{0.6}{6400}$ m
$\text{K}_2 \text{SO}_4$	0	$\frac{0.9}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{512}$	$\frac{1.1}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{256}$	$\frac{1.2}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{128}$	$\frac{1.3}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{64}$	$\frac{1.4}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{32}$	$\frac{1.7}{6400}$ m
$\text{K}_4 \text{Fe}(\text{CN})_6$	0	$\frac{0.9}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{16384}$	$\frac{0.9}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{8192}$	$\frac{1.0}{6400}$ m
	$\frac{\text{m}}{4096}$	$\frac{1.2}{6400}$ m

From this table we can recognize quite easily that the effect of monovalent anion is almost negligible in comparison with di- and tetravalent anions. And we can also see that there is a great difference between the di- and tetravalent anions in its effect. The higher its valency, the more effective its action.

The same effect can also be obtained by the addition of $1/256$ mol of K_2SO_4 and of $1/4096$ mol of $K_4Fe(CN)_6$. The effectiveness of ferrocyanide ion upon the action of aluminium ion may be shown by the following experiment.

The method of the experiment remains just the same as above, the only difference being that we observed here only the precipitation grades, not the point of the complete precipitation.

TABLE III.

$K_4Fe(CN)_6$	$\frac{1}{25}$ mol	$\frac{1}{50}$ mol	$\frac{1}{100}$ mol	$\frac{1}{200}$ mol	$\frac{1}{400}$ mol	$\frac{1}{800}$ mol	$\frac{1}{1600}$ mol	$\frac{1}{3200}$ mol	$\frac{1}{6400}$ mol
$\frac{m}{2048}$							-	+	-
$\frac{m}{1024}$					-	±	+	-	
$\frac{m}{512}$				-	±	+	±	-	
$\frac{m}{256}$				-	+	±	-		
$\frac{m}{128}$			±	+	±	±	-		
$\frac{m}{64}$		±	+	±	-				
$\frac{m}{32}$	±	+	±	±					

It is also advisable to note in table 2, that there is obviously some effect of calcium ion on the side of aluminium ion. This being in mind it seemed to the author interesting to see the effect of $MgSO_4$ on the precipitation action of $AlCl_3$. Sulphate ion may act against the action of Al-ion, whereas magnesium ion may contribute to that of aluminium ion. The results obtained in the experiment with magnesium sulphate are as follows.

TABLE IV.

AlCl ₃ \ MgSO ₄	$\frac{m}{100}$	$\frac{m}{200}$	$\frac{m}{400}$	$\frac{m}{800}$	$\frac{m}{1600}$	$\frac{m}{3200}$	$\frac{m}{6400}$	$\frac{m}{12800}$	$\frac{m}{25600}$
$\frac{m}{80}$			-	-	±	±	+	±	-
$\frac{m}{32}$			-	±	±	±	±	±	±
$\frac{m}{16}$				-	-	±	±	±	±
$\frac{m}{8}$		-	-	±	±	±	+	±	±

The effect both of cation and anion can be recognized from this table, resulting in an indefinite margin of the precipitation range.

Hardy-Schulze's law states that in the precipitation of colloid the effectiveness of the electrolyte depends on the ion charged oppositely to the charge of the colloid and is proportional to the index of the valency of that ion. This can be, however, only approximately true when the other ion of that electrolyte is monovalent, the effectiveness of the monovalent ion being negligible in comparison to the oppositely charged polyvalent ion. When the valency of the similarly charged ion is higher the effect of that ion becomes visible and sometimes is very significant. This tells us that the ion of electrolyte charged the same as colloid, exercises also a definite influence upon the precipitation of colloid. Of course there may be some difference in their influence between the equally and oppositely charged ions, the oppositely charged ion being attracted by colloid, whereas the equally-charged ion is repulsed by the colloid.

IV. THE QUESTION OF ANTAGONISM OF MONO- AND DIVALENT ION.

As shown above the effect of any electrolyte upon the precipitation of colloid is composed of two opposed reactions. But monovalent ions have much weaker action which is sometimes quite negligible when we are dealing with the precipitation of colloid by the electrolyte of ion of higher valency. When, however, the action of the oppositely charged ions is not so pronounced, we can easily recognize the effect of ion charged the same as the colloid. For instance if we take the case of precipitation of lecithin by the addition of hydrochloric acid, it is notably affected by the presence of potassium chloride.

Experiment 3.

1 cc. of 0.5 per cent lecithin solution diluted with 2 cc. of distilled water was added with different amount of 1/10 m hydrochloric acid taking care that the total volume be maintained at 5 cc. by the previous addition of distilled water of different amounts according to the volume of hydrochloric acid to be added. By this test it was shown that 0.9 cc. of 1/10 m HCl solution was the minimal amount required. When we repeated the experiment by replacing 1 cc. of water by 1 cc. of 1/8 m KCl solution, much more hydrochloric acid was needed for the precipitation, the amount being 1.2 cc. It seems therefore in this case that anion had been more effective than cation. This effect of KCl can be counteracted by the addition of a certain amount of CaCl_2 , and its larger amount will easily overbalance the effect of KCl. This can be shown by the experiment conducted in the same manner as above, in which to the lecithin 1 cc. of 1/8 m KCl and 1 cc. of CaCl_2 of different concentration were added and different quantities of hydrochloric acid were poured into the mixture. The results of such experiments are reproduced in the following table.

TABLE V.

Mixture.	Amount of $\frac{m}{10}$ HCl added.											
	cc. 1.4	cc. 1.3	cc. 1.2	cc. 1.1	cc. 1.0	cc. 0.9	cc. 0.8	cc. 0.7	cc. 0.6	cc. 0.5	cc. 0.4	cc. 0.3
Lecithin + H ₂ O + H ₂ O	+	+	+	+	+	+	-	-				
„ + $\frac{m}{8}$ KCl + H ₂ O	+	+	+	-	-							
„ + „ + $\frac{m}{256}$ CaCl ₂	+	+	+	+	+	-	-					
„ + „ + $\frac{m}{128}$ „	+	+	+	+	+	+	-	-				
„ + „ + $\frac{m}{64}$ „	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		
„ + „ + $\frac{m}{32}$ „	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

As we can see from this table the addition of $1/8$ m KCl retards the precipitation of lecithin by acid owing possibly to the action of anion Cl', but the presence of $1/128$ m CaCl₂ counteracts the effect of KCl chiefly by virtue of cation Ca⁺⁺. From the conclusion obtained from the foregoing section this can be explained only by the balancing of the effect of total cations present to the effect of total amount of anions. There are many instances of counteraction of the salts with mono- and divalent cation in the realm of colloid chemistry and biology and some authors have called them the antagonistic action between mono- and divalent cations. But we have here, it seems to me, in reality only the antagonistic action between cations and anions, not between cations themselves. This seems to the author a very important point which must not be overlooked. The hypothesis of antagonism

between the similarly charged ions may not only be fruitful, but also it will be injurious as regards future researches.

REFERENCES.

- Burton, E. F. (1906; 1909): *Phil. Mag.* (6). **12**, 472; **17**, 583.
Koch, W. (1903): *Z. f. Physiol. Chem.* **37**, 181.
McLean.: *Lecithin and allied substances*. 1918.
Porges, O. and Neubauer, E. (1908): *Biochem. Z.* **7**, 152-77.
Robertson; (1918): *Physical Chemistry of Proteins*. 1918.